

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**A MELATONINA PROTEGE O FÍGADO NA CIRROSE BILIAR SECUNDÁRIA
EM RATOS**

JOSIELI RASKOPF COLARES

Porto Alegre
2020

JOSIELI RASKOPF COLARES

**A MELATONINA PROTEGE O FÍGADO NA CIRROSE BILIAR SECUNDÁRIA
EM RATOS**

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Doutora em
Medicina: Ciências Médicas, da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, Programa de Pós-Graduação em
Medicina: Ciências Médicas.

Orientadora: Profa. Dra. Norma Possa Marroni

Porto Alegre

2020

CIP - CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (BIBLIOTECA UFRGS)

Dedicatória

À minha família, que sempre me incentivou e apoiou nesta trajetória, em especial minha filha Manuela, minha razão de viver e de procurar me tornar melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

A sensação de missão cumprida após muitos anos de estudo e dedicação é, sem sombra de dúvidas, um sentimento único e inexplicável de realização. Mas o melhor de tudo é poder olhar para trás e saber que isso só foi possível pois tive pessoas mais que especiais ao meu lado durante este trajeto. É poder vivenciar esta realização e poder dedicar a cada uma delas um pouquinho desta conquista.

Com base neste sentimento, agradeço a todos que de uma maneira ou de outra se fizeram presentes e me ajudaram ao longo desta trajetória. Em especial à Professora Doutora Norma Possa Marroni, minha orientadora, pessoa a qual agradeço inúmeros ensinamentos, dentre estes, um enorme aprendizado acadêmico e de vida, agradeço-lhe infinitamente por todo apoio, incentivo e, acima de tudo, toda confiança que sempre depositou em mim. Saiba que sempre foi e sempre será uma honra dizer que fostes minha orientadora.

Às amigas Elizangela Gonçalves Schemidt, Francielli Licks e Sandielly Rebeca Benitez da Fonseca, os caminhos da vida acabaram nos distanciando, mas quero que saibam que vocês foram partes fundamentais deste processo. Gurias, muito obrigada por todo apoio de sempre, por nossos momentos de descontração e pelo auxílio recebido.

À minha mais que amiga, Renata Minuzzo Hartmann, uma das pessoas de coração mais puro que já conheci e tive o prazer de conviver. Muito obrigada por ter estado comigo até o fim. Renatinha, de coração, muito obrigada por tudo, pelo carinho, companheirismo, risos trocados e disponibilidade de sempre. Obrigada por me dar a honra de poder tê-la fazendo parte da minha vida.

Aos demais colegas e colaboradores do Laboratório de Ciências Pneumológicas e Inflamação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, meu sincero agradecimento pelo carinho recebido e conhecimentos compartilhados.

À família que Deus me deu, em especial aos meus pais, Lucimara e Valter, agradeço pelos ensinamentos, exemplo de vida e apoio. Obrigada por sempre terem acreditado em mim e em meus sonhos, eu os amo muito.

Ao meu esposo, Ricardo! Muito obrigada por me incentivar e trilhar comigo este caminho. Obrigada por seu amor, carinho, apoio, compreensão e companheirismo ao longo destes anos. Você foi fundamental em todos os momentos.

À minha princesinha, meu anjinho, minha filha Manuela, razão do meu viver. Um anjo em forma de menina que Deus enviou para que eu pudesse ter o privilégio de um sentimento indescritível e único, o amor materno. Filha, muito obrigada por existir, você é e sempre será o melhor de mim, mamãe te ama infinitamente.

E por fim, agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, à equipe do programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, pela oportunidade de realizar os estudos nesta instituição.

RESUMO

Introdução: A cirrose hepática caracteriza-se pelo surgimento de septos e nódulos fibróticos, bem como alterações funcionais do fígado decorrentes da morte dos hepatócitos e alterações estruturais do órgão. A obstrução prolongada do ducto biliar em ratos é um modelo experimental eficaz para indução de cirrose biliar secundária. A melatonina (MLT) é um hormônio lipofílico sintetizado a partir do aminoácido triptofano. **Objetivo:** Avaliar o efeito da MLT na modulação da homeostase redox celular, processo inflamatório, fibrogênico e dano tecidual no fígado de ratos com cirrose hepática induzida pela ligadura de ducto biliar (LDB). **Métodos:** Foram utilizados 24 ratos machos Wistar (peso médio de 300 g), distribuídos em quatro grupos: controle (CO), controle mais melatonina (CO+MLT), cirrose (LDB) e cirrose mais melatonina (LDB+MLT). A MLT foi administrada diariamente por via intraperitoneal na dose de 20 mg/Kg, iniciando-se no 15º dia após a LDB. Decorridos 28 dias de LDB, os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado para análises de enzimas de integridade hepática (AST, ALT e FA). Após os animais foram eutanasiados por overdose anestésica. O baço e o fígado foram retirados e pesados para os índices hepatossomático e esplenossomático. Após o fígado foi dividido em seções para armazenamento e posteriores avaliações de lipoperoxidação (LPO), atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), níveis de glutathione (GSH) níveis dos metabólitos do óxido nítrico (nitritos/nitratos), quantificação de proteína total, avaliação por multiplex da citocina inflamatória IL-1 β , avaliação de danos ao DNA (micronúcleos e ensaio cometa), análise histológica pela coloração de hematoxilina e eosina (HE) e picrossírius, análise imunohistoquímica das proteínas (iNOS, TNF- α , NF- κ B, Nrf2, NQO1 e HSP 70), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise molecular por *Western Blot* das proteínas NF- κ B e HSP 70. **Resultados:** A melatonina diminuiu os índices hepatossomático e esplenossomático, os níveis das enzimas de integridade hepática e proteína total. Diminuiu a LPO, níveis de óxido nítrico, danos ao DNA, níveis da interleucina-1 β e expressão da iNOS, TNF- α , NF- κ B e HSP 70. Aumentou a atividade da SOD e CAT, expressão do Nrf2, bem como reestabeleceu a expressão da NQO1, GPx,

GST e GSH. Demonstrou-se eficaz na restauração do parênquima hepático.

Conclusão: Sugere-se que a melatonina possa apresentar-se como uma possível opção terapêutica para cirrose. A mesma desempenhou um papel restaurador em todos padrões avaliados, possivelmente por sua ação antioxidante e anti-inflamatória, demonstradas pelas avaliações realizadas neste estudo.

Palavras chave: estresse oxidativo, antioxidante, cirrose hepática, melatonina.

ABSTRACT

Introduction: Liver cirrhosis is characterized by the appearance of fibrotic septa and nodules, as well as functional changes in the liver resulting from the death of hepatocytes and structural changes in the organ. Prolonged bile duct obstruction in rats is an effective experimental model for inducing secondary biliary cirrhosis. Melatonin (MLT) is a lipophilic hormone synthesized from the amino acid tryptophan. **Objective:** To evaluate the effect of MLT on the modulation of cellular redox homeostasis, inflammatory process, fibrogenic and tissue damage in the liver of rats with liver cirrhosis induced by bile duct ligation (BDL). **Methods:** 24 male Wistar rats (average weight 300 g) were used, distributed in four groups: control (CO), control plus melatonin (CO+MLT), cirrhosis (BDL) and cirrhosis plus melatonin (BDL+MLT). MLT was administered daily intraperitoneally at a dose of 20 mg/kg, starting on the 15th day after BDL. After 28 days of BDL, the animals were anesthetized and blood was collected for liver integrity enzyme analysis (AST, ALT and FA). After the animals were euthanized by anesthetic overdose. The spleen and liver were removed and weighed for hepatosomatic and splenosomatic indexes. After the liver was divided into sections for storage and further assessments of lipoperoxidation (LPO), activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), glutathione levels (GSH) levels of nitric oxide metabolites (nitrites / nitrates), quantification of total protein, multiplex evaluation of the inflammatory cytokine IL-1 β , DNA damage evaluation (micronuclei and comet assay), histological analysis by hematoxylin and eosin staining (HE) and picrosirius, immunohistochemical analysis of proteins (iNOS, TNF- α , NF- κ B, Nrf2, NQO1 and HSP 70), scanning electron microscopy (SEM) and molecular analysis by Western Blot of NF- κ B and HSP 70 proteins. **Results:** Melatonin decreased the hepatosomatic and splenosomatic indices, the levels of liver integrity enzymes and total protein. Decreased LPO, nitric oxide levels, DNA damage, interleukin-1 β levels and iNOS, TNF- α , NF- κ B and HSP 70 expression. Increased SOD and CAT activity, Nrf2 expression, as well as established expression of NQO1, GPx, GST and GSH. It has been shown to be effective in restoring the liver parenchyma. **Conclusion:** It is suggested that melatonin may present itself as a possible

therapeutic option for cirrhosis. It played a restorative role in all evaluated patterns, possibly due to its antioxidant and anti-inflammatory action, demonstrated by the evaluations carried out in this study.

Keywords: oxidative stress, antioxidant, hepatic cirrhosis, melatonin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas.	22
Figura 2. Estrutura do fígado.....	23
Figura 3. Estrutura microscópica do fígado.....	24
Figura 4. Detalhes da estrutura hepática.	25
Figura 5. Célula estrelada hepática.....	26
Figura 6. Arquitetura hepática com injúria crônica	27
Figura 7. Modelo experimental de LDB	32
Figura 8. Estresse oxidativo	33
Figura 9. Fontes de radicais livres.....	35
Figura 10. Esquema ilustrativo da formação de ERO.	36
Figura 11. Metabolismo do NO.....	38
Figura 12. Via do Nrf2	39
Figura 13. Interação entre enzimas antioxidantes e radicais livres..	41
Figura 14. Adaptação do sistema glutathiona..	42
Figura 15. Via de ativação do NF- κ B.....	46
Figura 16. Produção das proteínas de choque térmico.....	48
Figura 17. Biossíntese da melatonina	49
Figura 18. Estrutura química da melatonina.....	50
Figura 19. Marco teórico esquemático do estudo.....	53

Artigo I

Figure 1. Bile duct ligation surgery	82
Figura 2. Mean hepatosomatic and splenosomatic index values in the different experimental groups.....	83
Figura 3. Lipoperoxidation markers and glutathione levels in the different experimental groups.....	84
Figure 4. Histological analysis of liver tissue in the different experimental groups	85
Figura 5. Histological analysis of liver tissue in the different experimental groups.....	86

Figura 6. Expression of inducible nitric oxide synthase in the different experimental groups	87
Figure 7. Expression of tumor necrosis factor in the different experimental groups	88

Artigo II

Figure 1. Photomicrography of liver tissue (HE) in 200x magnification, in the different experimental groups	116
Figura 2. Morphological analysis by scanning electron microscopy in the liver of animals submitted to BDL surgery.....	117
Figura 3. Effect of melatonin on liver integrity enzymes: aspartate aminotransferase (AST), alanine aminostransferase (ALT) and alkaline phosphatase (AP) in plasma of animals undergoing BDL surgery.	118
Figure 4. Effect of melatonin on total protein levels in the liver of animals undergoing BDL surgery	119
Figura 5. Effect of melatonin on the levels of interleukin IL-1 β in the liver of animals undergoing LDB surgery	120
Figura 6. Effect of melatonin on quantification by immunohistochemistry analysis (A) and expression by western blot technique (B) of NF- κ B in the liver of animals submitted to BDL surgery.....	121
Figura 7. Effect of melatonin on quantification by immunohistochemistry analysis (A) and expression HSP 70 by western blot technique (B) in the liver of animals submitted to BDL surgery.....	122
Figure 8. Effect of melatonin on quantification by immunohistochemistry analysis of Nrf2 in the liver of animals submitted to BDL surgery.....	123
Figura 9. Effect of melatonin on quantification by immunohistochemistry analysis of NQO1 in the liver of animals submitted to BDL surgery.	124

LISTA DE TABELAS

Artigo I

Table 1. Plasma levels of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and alkaline phosphatase in the different experimental groups.....89

Table 2. Activity of antioxidant enzymes in the different experimental groups90

Artigo II

Table 1. Activity of lipoperoxidation levels, antioxidant enzyme SOD and nitric oxide levels in the different experimental groups.....125

Table 2. Comet assay in liver tissue of the rats with BDL treated or not with melatonin.....126

Table 3. Micronucleus test in bone marrow of the rats with BDL treated or not with melatonin.....127

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	<i>Alfa</i>
β	<i>Beta</i>
ALT	Alanina aminotransferase
AOX	Antioxidante
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ARE	Elemento de resposta antioxidante
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca ⁺²	Cálcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Catalase
CCl ₄	Tetracloreto de carbono
CEH	Células estreladas hepáticas
CO	Controle
CO + MLT	Controle + melatonina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EO	Estresse oxidativo
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FA	Fosfatase alcalina
FIPE	Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino
g	Gramas
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
GSSH	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HCV	Vírus da hepatite C

HE	Hematoxilina e eosina
HSE	Elemento de choque térmico
HSF	Fator de choque térmico
HSP	Proteínas de choque térmico
IFN	Interferon
IL	Interleucinas
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
i.p.	Intraperitoneal
Keap1	<i>Kelch-like ECH associated protein 1</i>
Kg	Quilograma
LDB	Ligadura de ducto biliar
LDB + MLT	Ligadura de ducto biliar + melatonina
LPO	Lipoperoxidação
MEC	Matriz extracelular
MLT	Melatonina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
mL	Mililitros
NADPH	Fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo
NASH	Esteatohepatite não alcoólica
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NO₂	Nitrito
NO₃	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
Nrf2	Fator de transcrição nuclear eritróide 2
O^{•-}	Oxigênio <i>singlet</i>
O₂	Oxigênio
O₂^{•-}	Ânion radical superóxido
OH[•]	Radical hidroxila
ONOO⁻	Peroxinitrito
RE	Retículo endoplasmático
RL	Radicais livres
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TGF- β Fator de crescimento transformante *beta*

TNF- α Fator de necrose tumoral *alfa*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 Estratégia para localizar e selecionar informações.....	21
2.2 Estrutura e função do fígado.....	23
2.3 Cirrose hepática.....	26
2.3.1 Epidemiologia e etiologia.....	28
2.4 Cirrose biliar secundária	29
2.5 Modelo experimental de cirrose biliar secundária	31
2.6 Estresse oxidativo e nitrosativo	33
2.6.1 Estresse oxidativo	33
2.6.2 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio.....	34
2.6.3 Estresse nitrosativo	37
2.7 Defesas antioxidantes.....	39
2.7.1 Antioxidantes enzimáticos	40
2.7.2 Antioxidantes não enzimáticos	42
2.8 Mediadores inflamatórios.....	43
2.8.1 Citocinas.....	44
2.8.2 Fator de transcrição nuclear kappa B	45
2.9 Proteínas de choque térmico	47
2.10 Melatonina	48
3 MARCO CONCEITUAL.....	53
4 JUSTIFICATIVA	54
5 OBJETIVOS	55
5.1 Objetivo geral.....	55
5.2 Objetivos específicos.....	55
5.2.1 Objetivos específicos do artigo I.....	55
5.2.2 Objetivos específicos do artigo II	56
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
7 ARTIGOS	67
7.1 Artigo I	67
7.2 Artigo II	91

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	128
8.1 Artigo I	128
8.2 Artigo II	129
9 PERSPECTIVAS FUTURAS	130
10 ANEXOS	131

1 INTRODUÇÃO

Sendo o segundo maior órgão e glândula do corpo, o fígado humano pesa aproximadamente 1,5 Kg em sua fisiologia normal. Este é composto por hepatócitos, células funcionais que compõem cerca de 70% do órgão (Zimmerman, 1999; Netter, 2015).

O fígado exerce inúmeras funções vitais à regulação do metabolismo, atuando, por exemplo, na síntese proteica e molecular, no armazenamento de proteínas e ferro, na degradação de hormônios e na inibição e excreção de metabólitos (Coelho, 2012).

Sendo o fígado um órgão vital ao organismo, as doenças hepáticas apresentam-se de suma importância uma vez que estas representam um dos maiores problemas de saúde mundial. Neste contexto, sabe-se que a cirrose hepática está entre as doenças mais comuns, sendo citada pela alta mortalidade associada a mesma (Schuppan e Afdhal, 2008; Barnett, 2018).

A cirrose hepática caracteriza-se pelo surgimento de septos e nódulos fibróticos bem como, alteração estrutural e funcional do fígado causada pela morte dos hepatócitos (Elsharkawy et al., 2005; Friedman, 2008; Aydın e Akçali, 2018).

Conforme citado, a cirrose representa um grande problema de saúde mundial. Neste sentido, pesquisas estão sendo realizadas objetivando o desenvolvimento e compreensão de substâncias que possam ser utilizadas como tratamento, visando a cura; ou até mesmo para serem utilizadas como terapias alternativas no suporte à vida, aumentando assim a sobrevivência e a qualidade de vida dos pacientes e evitando a progressão da doença (Rezaei et al., 2008; Bona et al., 2012; Fernandes et al., 2012; Colares et al., 2016).

A obstrução prolongada do ducto biliar em ratos é um modelo experimental eficaz para indução de cirrose biliar secundária e fibrose, visto que são estabelecidas as características próprias da doença em um período de 28 dias.

Durante este período, a obstrução provoca uma dilatação do ducto biliar, edema e reações inflamatórias agudas em função do refluxo biliar e surgimento de fibrose periportal devido a alterações de síntese e degradação de proteínas como o colágeno, causando uma desorganização do parênquima hepático (Kountouras et al., 1984; Vercelino et al., 2010; Vieira et al., 2011; Colares et al., 2016).

Neste estudo foram avaliadas as alterações hepáticas e fisiológicas decorrentes da cirrose biliar secundária induzida pelo modelo experimental de ligadura de ducto biliar em ratos e os efeitos do tratamento com a melatonina após estabelecimento da doença.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório Experimental de Gastroenterologia e Hepatologia do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e contou com o auxílio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA), processo número 2016-0373, e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – suporte financeiro 001.

A estrutura desta tese está dividida em seções: 1– Introdução; 2- Referencial teórico, 3- Marco conceitual, 4- Justificativa, 5- Objetivos, 6- Referências bibliográficas, 7- Artigo, 8- Considerações finais, 9- Perspectivas futuras, 10- Anexos. Seguindo assim, as normas do Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estratégia para localizar e selecionar informações

Esta revisão bibliográfica explorou os principais aspectos relacionados com a cirrose hepática, relacionando o envolvimento do estresse oxidativo, do processo inflamatório e fibrótico, das proteínas de choque térmico e alterações morfológicas, bem como o uso da melatonina (MLT) como estratégia terapêutica. Considerando-se a ação da MLT na redução dos parâmetros de dano avaliados e processo fibrogênico hepático como desfecho.

Para localizar as informações utilizou-se as bases de dados PubMed e SciELO. Também foram consultadas monografias, dissertações e teses de diversas universidades brasileiras e estrangeiras, além de livros-texto. Foram realizadas buscas através dos termos e combinações apresentadas na Figura 1.

PubMed	Palavras chave	SciELO
124.104	1. Liver cirrhosis	1.016
4.930	2. Bile duct ligation	50
236.890	3. Oxidative stress	2.519
730.636	4. Inflammation	4.867
73.873	5. Heat shock protein	151
599.356	6. Antioxidants	1.594
26.696	7. Melatonin	201
<div> <p> $1+2= 1.447$ $1+3= 2.141$ $1+4= 8.459$ $1+5= 182$ $1+6= 4.756$ $1+7= 82$ $1+2+3= 131$ $1+2+3+4= 41$ $1+2+3+4+5= 0$ $1+2+3+4+5+6= 0$ $1+2+3+4+5+6+7= 0$ </p> </div> <div> <p> $1+2= 201$ $1+3= 16$ $1+4= 41$ $1+5= 0$ $1+6= 5$ $1+7= 1$ $1+2+3= 3$ $1+2+3+4= 0$ $1+2+3+4+5= 0$ $1+2+3+4+5+6= 0$ $1+2+3+4+5+6+7= 0$ </p> </div>		

Figura 1: Estratégia de busca de referências bibliográficas. Fonte: autora.

2.2 Estrutura e função do fígado

Localizado no quadrante superior direito do abdômen onde encontra-se protegido pelas costelas inferiores, o fígado é o maior órgão interno do organismo, pesando em média 1,5 Kg e medindo cerca de 15 cm em seu plano coronal e 20 cm no plano transversal, e representando cerca de 3% do peso corporal de um indivíduo adulto (Trivião e Abib, 2003; Coelho, 2012, Netter, 2015).

Morfologicamente, o fígado apresenta 4 lobos, sendo dois maiores e dois menores. Os dois lobos maiores, direito e esquerdo, são separados pela fissura umbilical na face inferior e pelo ligamento falciforme na face ântero-superior. Entre eles há uma nítida diferença de volume com acentuado predomínio do direito sobre o esquerdo (figura 2) (Netter, 2015).

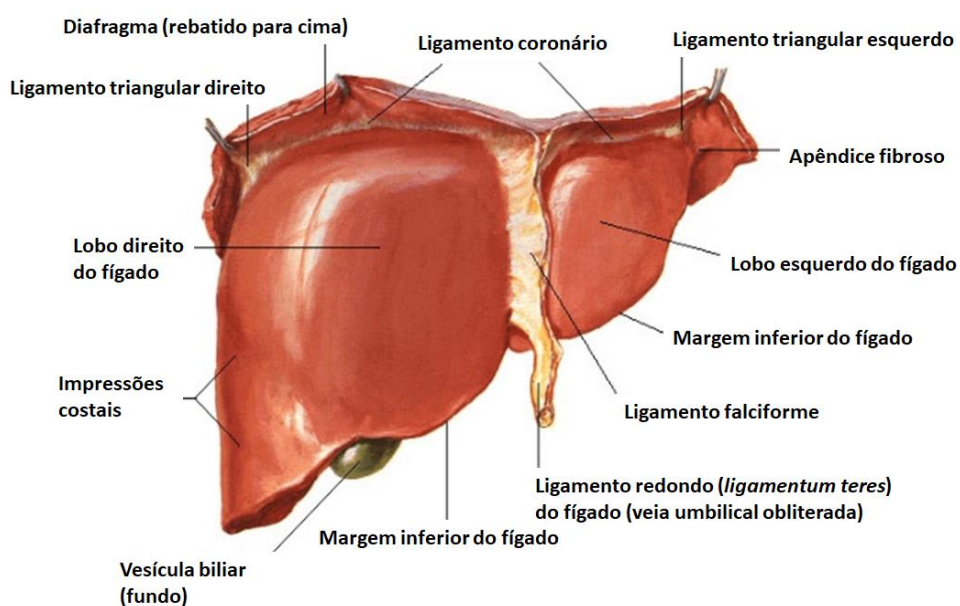


Figura 2. Estrutura do fígado. Fonte: (Netter, 2015).

Sendo este um órgão vital para a manutenção da vida devido suas atividades de síntese e de excreção, este apresenta-se como uma estrutura complexa, constituído principalmente por células hepáticas (hepatócitos), que se anastomosam, ou seja, ligam-se umas às outras constituindo assim os lóbulos hepáticos (Coelho, 2012).

Nos lobos hepáticos, os hepatócitos, ou células hepáticas, dispõem-se de maneira uniforme formando placas ordenadas radialmente a partir de uma veia centrolobular e entrelaçadas de maneira ordenada por sinusóides hepáticos. Este são basicamente condutos de sangue sem parede estruturada que apresentam-se revestidos por células endoteliais típicas e macrófagos que, no fígado, são conhecidos como células de Kupffer (figura 3) (Triviño e Abib, 2003; Trefts et al., 2017).

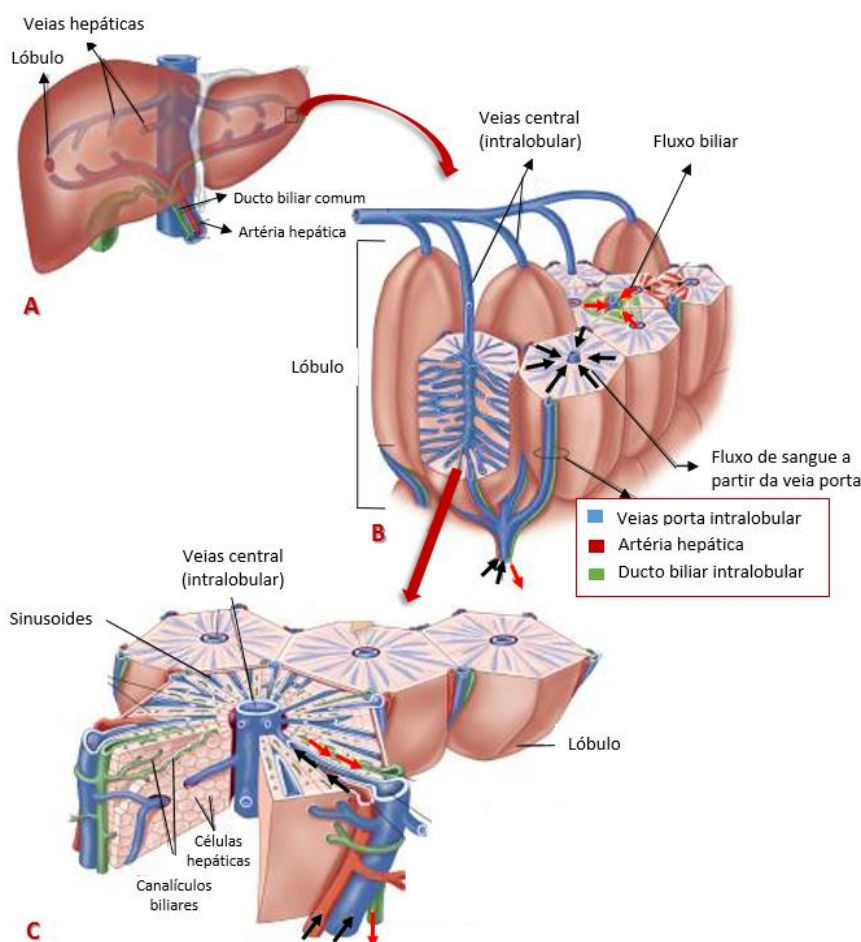


Figura 3: Estrutura microscópica do fígado. (A) Localização dos lóbulos e circulação hepática. (B) (C) Transporte do sangue das veias porta e artérias hepáticas através dos sinusóides e distribuição de células hepáticas na direção de uma veia central em cada lóbulo (setas pretas). Formação da bile nos hepatócitos e transporte através de canalículos biliares (setas vermelhas). Fonte: Adaptado (Patton e Thibodeau, 2013).

As células de Kupffer são conhecidas por sua função fagocitária e podem ser ativadas por diferentes fatores, dentre estes pode-se citar as endotoxinas, sepse, ácido araquidônico e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), entre outros. Independentemente do fator associado, a ativação destas resulta na produção de citocinas, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), óxido nítrico (NO), interleucinas (IL), interferon (IFN) *alfa* (α) e *beta* (β), fator de crescimento transformante *beta* (TGF- β) e vários prostanóides (Triviño e Abib, 2003; Coelho, 2012; Bogdanos et al., 2013; Kubes e Jenne, 2018).

Limitando o sinusóide hepático temos uma estrutura denominada espaço subendotelial de Disse. Neste são encontradas as células estreladas hepáticas (CEH), também conhecidas como células de Ito. As CEH são formadas por longas extensões citoplasmáticas que conferem a estas um formato característico de estrela (figura 4). Fisiologicamente, são conhecidas por suas propriedades contráteis e fibrogênica, além de serem o principal local de síntese de matriz extracelular (MEC) (Coelho, 2012; Friedman e Arthur, 2002; Dewidar et al., 2019).

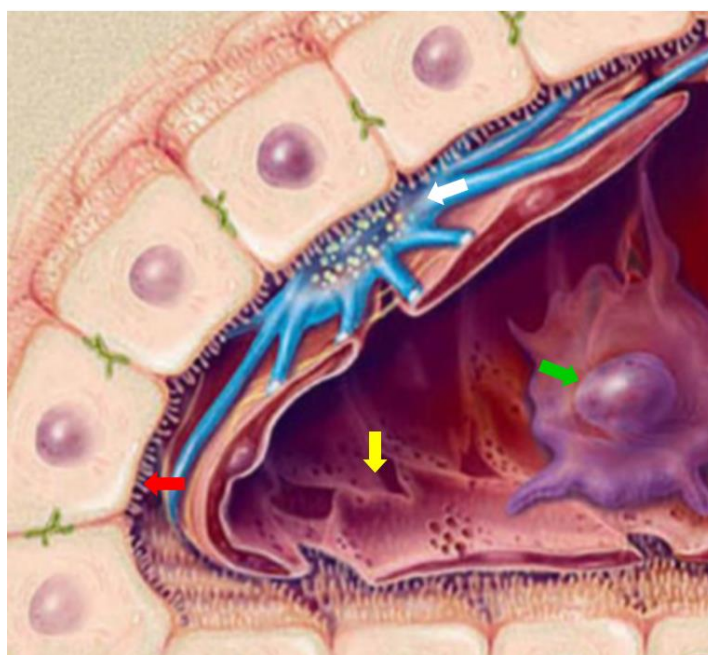


Figura 4: Detalhes da estrutura hepática. Espaço subendotelial de Disse com presença de células estreladas quiescentes (seta branca), células de Kupffer (seta verde), microvilosidades (seta vermelha) e fenestrações (seta amarela). Fonte: Adaptado (Friedman e Arthur, 2002).

Além disso, as CEH fazem parte de um grupo de células heterogêneas que se diferem pela capacidade de armazenamento de lipídeos, expressão e organização de filamentos do citoesqueleto e eficácia para produção de MEC, sendo que estes aspectos refletem a capacidade da célula apresentar dois fenótipos: quiescente e ativado (figura 5) (Friedman, 2008; Lurie et al., 2015; Trefts et al., 2017).

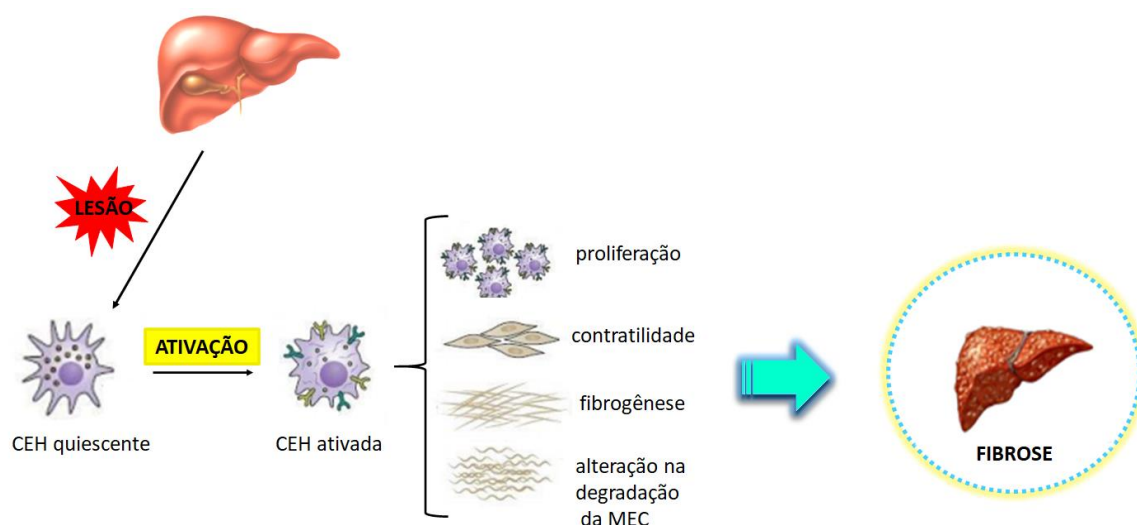


Figura 5: Célula estrelada hepática, forma quiescente e ativada. Fonte: Adaptado (Friedman, 2008).

2.3 Cirrose hepática

Caracterizada pela desestruturação do parênquima hepático, a cirrose hepática é o estado mais avançado da fibrose, estando diretamente associada ao surgimento de septos e nódulos fibróticos, alterações do fluxo sanguíneo hepático, ao risco de falência hepática e alterações significativas a nível nutricional e sistêmico (Friedman, 2008; Barnett, 2018; López-Sánchez et al., 2020).

Sendo considerada uma resposta cicatrizante hepática que se dá em decorrência de diferentes agressões podendo estas serem de natureza

inflamatória, tóxica, metabólica ou congestiva (Friedman, 2008; Smith et al., 2019). Sabe-se que, tanto a fisiopatologia quanto a histopatologia da cirrose, variam conforme o agente etiológico; porém, seu padrão histológico final define-se por um processo difuso caracterizado por presença expressiva de fibrose que faz com que o fígado deixe de ter uma arquitetura normal e passe a apresentar nódulos estruturais que, conforme seu progresso, acabam por comprometer a funcionalidade do órgão (Conn e Atterbury, 1993; Schuppan e Afdhal, 2008; Lurie et al., 2015; Barnett, 2018; Parola e Pinzani, 2019).

Em casos de lesão hepática mais agravada, a matriz fibrilar produzida a partir da ativação das CEH, passa a ser acumulada no espaço subendotelial de Disse podendo ou não estar associada a ativação das células de Kupffer dentro dos sinusóides. A formação e depósito fibrilar nos hepatócitos resulta na perda das microvilosidades e reduz o tamanho e número de fenestrações presentes neste espaço, como consequência, tem-se um comprometimento da passagem de substâncias através do hepatócito (figura 6) (Friedman e Arthur, 2002, Weiskirchen e Tacke, 2014; Tsuchida e Friedman, 2017; Dewidar et al., 2019).

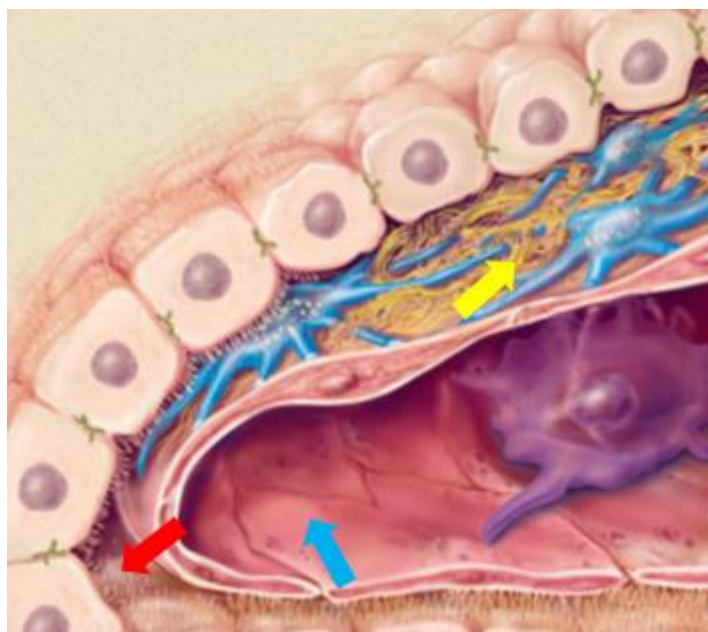


Figura 6: Arquitetura hepática com injúria crônica. Espaço subendotelial com presença de fibrose (seta amarela), perda de fenestrações (seta azul) e microvilosidades (seta vermelha). Fonte: Adaptado (Friedman e Arthur, 2002).

Sabe-se que diferentes elementos celulares, como fibroblastos, miofibroblastos e hepatócitos, estão envolvidos na formação e deposição de MEC e estes, quando ativados, independente da etiologia, passam a apresentar uma maior capacidade de proliferação, motilidade, contratilidade, síntese de colágeno e componentes de matriz além de levar à formação de um ciclo vicioso onde as células fibrogênicas passam a estimular umas às outras (Zimmerman, 1999; Zhou et al., 2014).

2.3.1 Epidemiologia e etiologia

A prevalência exata da cirrose em todo o mundo é desconhecida, no entanto, a literatura demonstra uma prevalência de 0,3% de cirrose na população dos Estados Unidos. Números semelhantes foram relatados na Europa, e os números são ainda maiores na maioria dos países asiáticos e africanos onde a hepatite viral crônica B ou C são frequentes, sendo responsável por aproximadamente 1,1% das mortes anuais (Teh et al., 2007; Schuppan e Afdhal, 2008).

Em 2013 a cirrose foi considerada a 13^a causa de morte no mundo e, acredita-se que em pouco tempo, alcançará a 12^a posição, entre as causas de óbito. No Brasil a cirrose de etiologia viral corresponde a 48% dos casos (aproximadamente 37% decorrentes de hepatite C e 11% de hepatite B). Assim, considerou-se que 52% dos casos de cirrose relacionam-se ao consumo de álcool e outras causas, tendo maiores taxas de prevalência em indivíduos entre 45 a 59 anos (Portugal et al., 2015). Uma vez que a cirrose compensada geralmente não é detectada por períodos prolongados de tempo, uma estimativa razoável é que até 1% da população pode apresentar a doença. Isso pode ser uma subestimação, pois reconhecemos a alta prevalência de cirrose não diagnosticada tanto em esteatohepatite não alcoólica (NASH) quanto em hepatite C (Schwartz e Reinus, 2012; Blachier et al., 2013; Lee et al., 2015; Kim et al., 2017).

Diferentes etiologias podem levar a alterações e danos ao parênquima hepático, tais como: doença hepática induzida por fármacos e toxinas, xenobióticos, hepatites virais, doenças hepáticas metabólicas ou vasculares, entre outras causas (Strauss et al., 2015; Crismale e Friedman, 2020). A etiologia da cirrose geralmente pode ser identificada pelo histórico do paciente combinada com a avaliação sorológica e histológica (Blachier et al., 2013).

A doença hepática alcoólica e a hepatite C são as causas mais comuns no mundo ocidental, enquanto a hepatite B prevalece na maior parte da Ásia e África. Após a identificação do vírus da hepatite C (HCV) e da NASH em obesos e diabéticos, raramente é feito o diagnóstico de cirrose sem causa aparente (cirrose criptogênica). É importante conhecer a etiologia da cirrose, pois ela pode prever complicações e direcionar as decisões de tratamento. Além disso, também permite a discussão de medidas preventivas, por exemplo, com familiares de pacientes com cirrose alcoólica ou hepatite viral crônica, e consideração de testes genéticos e conselhos preventivos para parentes de pacientes com doenças como hemocromatose ou doença de Wilson (Schwartz e Reinus, 2012; Hernaez et al., 2017).

Múltiplos fatores etiológicos contribuem para o desenvolvimento de cirrose, conforme exemplificado em estudos epidemiológicos que identificaram o consumo regular (moderado) de álcool, idade acima de 50 anos e sexo masculino como fatores de risco para hepatite C ou obesidade em idade avançada, resistência à insulina, hipertensão e hiperlipidemia (todas as características da síndrome metabólica) em NASH (Teh et al., 2007; Schuppan e Afdhal, 2008; Zhou et al., 2014; Lee et al., 2015).

2.4 Cirrose biliar secundária

A cirrose biliar secundária é uma complicação tardia da obstrução prolongada das vias biliares extra-hepáticas que leva a alterações estruturais e funcionais do fígado. A nível celular, tais alterações podem ser definidas como um

desequilíbrio entre os processos oxidantes e antioxidantes que, por sua vez, estimulam o processo de lipoperoxidação (LPO) (Silva e D'albuquerque, 1986; Peres et al., 2000; Vercelino et al., 2010; Jansen et al., 2017).

Neste contexto, a cicatrização de feridas hepáticas surge em resposta a estes estímulos nocivos crônicos podendo levar ao desenvolvimento de fibrose hepática (Tieppo et al., 2009; Vercelino et al., 2010; Colares et al., 2016).

O dano hepático colestático é um processo característico da cirrose biliar secundária e define-se com base em critérios histopatológicos e bioquímicos bem descritos. Em casos em que a colestase de longa duração representa a principal causa de dano hepático, o acúmulo de ácidos biliares tóxicos exerce um papel fundamental na determinação da necrose e, com isso, na fibrose hepática (Pastor et al., 1997; Orellana et al., 2000; Jansen et al., 2017; Woolbright e Jaeschke, 2019).

Os ácidos biliares são bem descritos e têm sua toxicidade atribuída a diferentes mecanismos, incluindo as suas propriedades detergentes, a alteração da homeostase do cálcio (Ca^{+2}) intracelular, a depleção do trifosfato de adenosina (ATP) e o dano mitocondrial. Diferentes estudos sugerem que as espécies reativas de oxigênio (ERO) e a formação de radicais livres (RL) estão envolvidos na patogênese do dano colestático hepático e progressão da cirrose (Singh et al., 1992; Parola et al., 1996; Tieppo et al., 2009; Vercelino et al., 2010; Colares et al., 2016).

A cirrose biliar surge frequentemente em função de anormalidades no sistema imunológico, com consequente processo inflamatório, obstrução de ductos biliares e consumo de álcool. Neste contexto, a cicatrização de feridas hepáticas surge em resposta a estes estímulos nocivos crônicos podendo levar ao desenvolvimento de fibrose hepática (Tieppo et al., 2009; Vercelino et al., 2010; Colares et al., 2016).

Nos estágios iniciais da doença é possível que sintomas como: enjoos, náuseas, angiomas localizados acima da cintura, além de dores na região do

fígado e perda de peso surjam. O agravamento do quadro clínico, quando o fígado já não consegue mais desenvolver suas funções, pode levar ao surgimento de sintomas mais agravados como: ascite, icterícia, hipertensão portal e encefalopatia hepática (Hernaez et al., 2017; Dhaliwal et al., 2020).

Sendo assim, levando-se em consideração as diferentes causas, progressões e complicações da cirrose, as atenções têm sido focadas em estudos básicos e clínicos na tentativa de melhorar o prognóstico dos pacientes através de terapias diversas que atuem retardando ou impedindo a progressão da doença (Peres et al., 2000; Tieppo et al., 2009; Vercelino et al., 2010; Colares et al., 2016).

2.5 Modelo experimental de cirrose biliar secundária

A obstrução prolongada do ducto biliar (ligadura de ducto biliar comum) em ratos é um modelo experimental para induzir cirrose biliar secundária e fibrose, visto que neste se estabelecem as características próprias da doença em torno de 14 dias (Kountouras et al., 1984; Peres et al., 2000; Tieppo et al., 2009).

Durante este período, a obstrução provoca uma dilatação do ducto biliar, edema, além de reações inflamatórias agudas em função do refluxo biliar e surgimento de fibrose periportal devido a alterações de síntese e degradação de proteínas como o colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos, causando uma desorganização da arquitetura natural do parênquima (Peres et al., 2000; Tieppo et al., 2005; Rezaei et al., 2008; Vercelino et al., 2008, 2010; Vieira et al., 2011; Colares et al., 2016).

Em estudo publicado por Baldo et al. (2011), evidenciaram que ratos submetidos à ligadura de ducto biliar (LDB) apresentaram características de icterícia, como cauda e orelhas amareladas, no momento da morte. Além destas alterações, no modelo animal realizado em ratos, é possível observar hepatomegalia e esplenomegalia, que ocorre, principalmente, em função do aumento do tecido conjuntivo, assim como do epitélio biliar, e, paralelamente,

também pode ocorrer o surgimento de um quadro de hipertensão portal em consequência da dilatação de veias esplênicas (Yaari et al., 1992; Tieppo et al., 2009; Baldo et al., 2011; Colares et al., 2016).

A figura 7 ilustra o modelo de cirrose biliar secundária por LDB estabelecido por Kountouras et al. (1984) e adaptado por Fernandes e Mies (1998) e até hoje muito utilizado por sua reprodutibilidade e capacidade de assemelhar-se com a doença hepática de humanos.

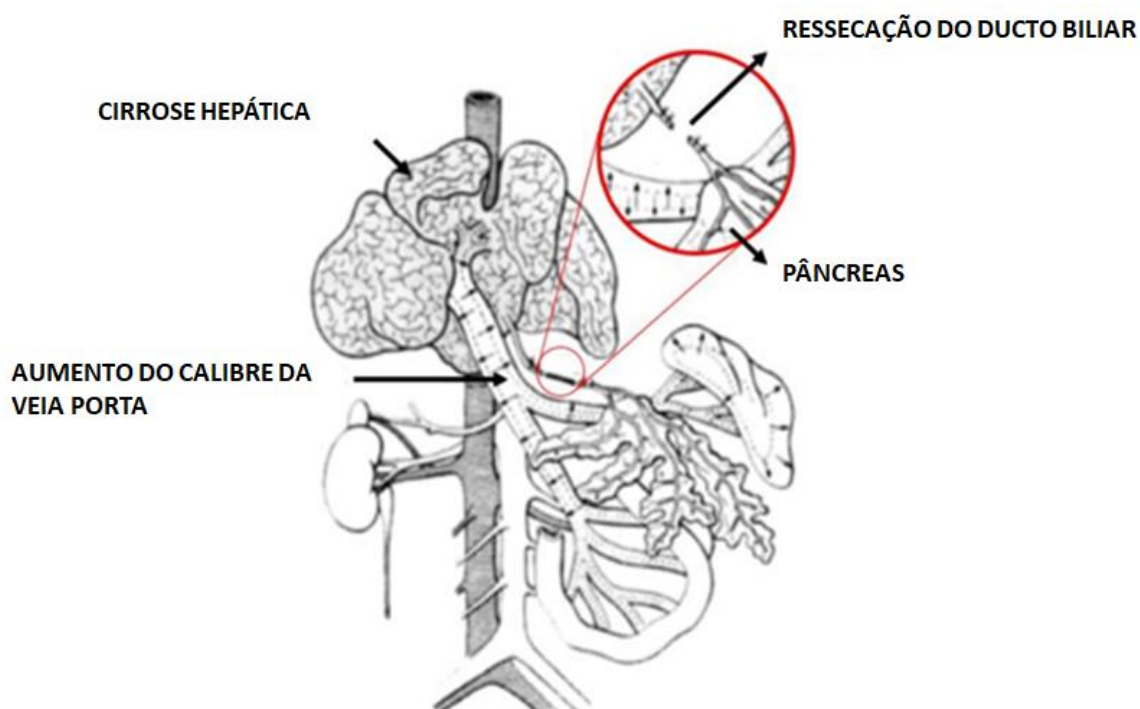


Figura 7: Modelo experimental de LDB. Fonte: Adaptado (Kountouras et al., 1984).

Chang e Ohara (1993), descreveram que animais submetidos ao modelo experimental de LDB apresentaram, além de cirrose biliar secundária, o desenvolvimento de diferentes anormalidades nas trocas gasosas.

Em estudos realizados por Tieppo et al. (2005), Vercelino et al. (2008) e Bosco et al. (2019) foi demonstrado que os animais com cirrose induzida por LDB apresentavam hipoxemia, aumento da LPO e alteração de enzimas antioxidantes em homogeneizado de fígado e pulmão.

Bona et al. (2012), utilizando outro modelo de cirrose experimental induzida por tetracloreto de carbono (CCl_4) concluíram que a administração do antioxidante quercetina mostrou-se eficaz na redução da fibrose e dano oxidativo em fígado de ratos.

Com base nessas evidências, fica claro que o dano oxidativo pode apresentar um papel fundamental no desenvolvimento e progressão da cirrose biliar secundária. Diversos estudos demonstraram que diferentes antioxidantes podem atuar de forma eficaz na redução do dano oxidativo e assim prevenir o desenvolvimento e a progressão da fibrose hepática podendo ser possíveis tratamentos para pacientes no futuro (Peres et al., 2000; Vercelino e al., 2008; Tieppo et al., 2009; Colares et al., 2016).

2.6 Estresse oxidativo e nitrosativo

2.6.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo (EO) é definido como um desequilíbrio entre as substâncias oxidantes e as defesas antioxidantes (AOX), a favor das oxidantes (figura 8) (Sies e Murphy, 1991).

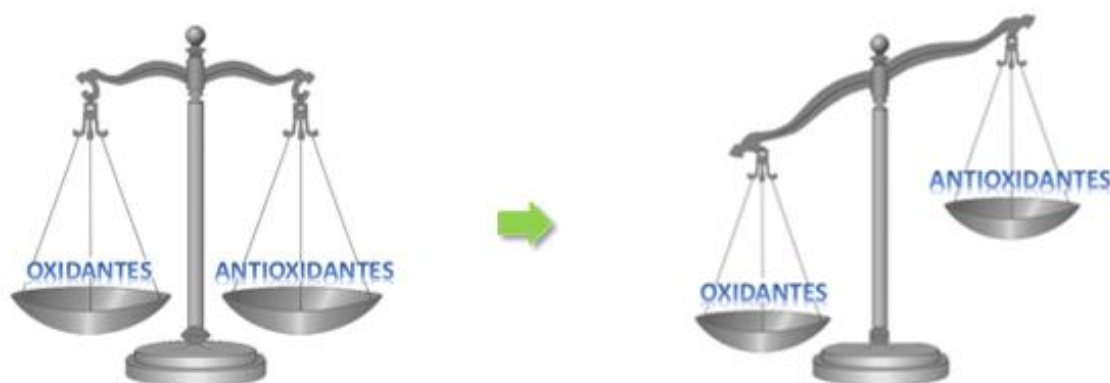


Figura 8: Estresse oxidativo. Desequilíbrio entre as substâncias oxidantes e antioxidantes na progressão do estresse oxidativo. Fonte: autora.

Como consequência desse desequilíbrio ocorre o quadro de EO com danos às biomoléculas, interrupção e exacerbação de sinais de transdução, além de mutações e processos apoptóticos. As consequências do EO podem ser desde danos sutis e até mesmo imperceptíveis ou agressivos e irreversíveis. A gravidade do dano basicamente depende do balanço entre a geração de ERO formada e a quantidade e disponibilidade de defesas antioxidantes disponíveis nas células (Sies e Murphy, 1991).

2.6.2 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio

A ocorrência e descrição de propriedades tóxicas do oxigênio tornaram-se conhecidas e passaram a ser estudadas após publicação da teoria de toxicidade dos RL proposta por Gershman et al. (1954), onde este afirma que a toxicidade do oxigênio é parcial em função das formas reduzidas que este possui.

Após o impacto inicial desta teoria, uma série de estudos passou a ser realizada com objetivo de explorar a presença de RL em diferentes sistemas biológicos. Estes estudos chegaram a algumas conclusões, como, por exemplo, o envolvimento dos RL no processo de envelhecimento, a descoberta da enzima superóxido dismutase (SOD), bem como a descoberta de que o radical hidroxila (OH^\cdot) leva à ativação da guanilato ciclase e à formação do segundo mensageiro, à guanosina monofosfato cíclico (Harman, 1956; McCord e Fridovich, 1969; Mittal e Murad, 1977).

Radicaís livres são definidos como qualquer espécie química, átomo ou molécula, capaz de existir independentemente e que possua um ou mais elétrons desemparelhados em qualquer orbital, normalmente no mais externo, podendo estes serem formados tanto em situações fisiológicas quanto patológicas e, quando produzido em grandes quantidades, agindo de forma danosa nas células e organismo (figura 9) (Halliwell, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2009).

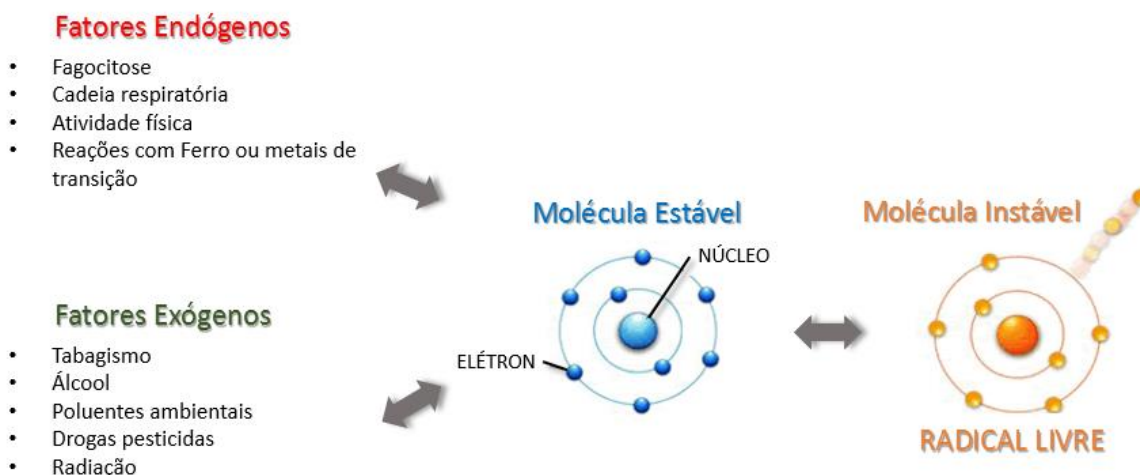


Figura 9: Fontes de radicais livres. Exemplos de fontes fisiológicas e patológicas de formação da radical livre a partir de uma molécula estável. Fonte: autora.

Segundo Valko et al. (2007), tanto as ERO quanto as espécies reativas de nitrogênio (ERN) são produtos gerados a partir do metabolismo celular normal, sendo estas bem conhecidas e caracterizadas por exercerem uma dupla função, podendo, assim, serem tanto deletérias/nocivas quanto benéficas para os sistemas vivos.

O oxigênio (O_2) é conhecido por ser um elemento essencial e também nocivo para as células, podendo ser, em certas condições, responsável pela ocorrência de reações químicas extremamente tóxicas e danosas ao organismo (Boveris e Chance, 1973).

Em seu estado normal, a molécula de O_2 é um birradical que possui dois elétrons desemparelhados, sendo um destes um bom agente oxidante, eficaz na oxidação de átomos ou moléculas, a partir da sua capacidade de aceitar um par de elétrons (figura 10) (Barp et al., 2002).

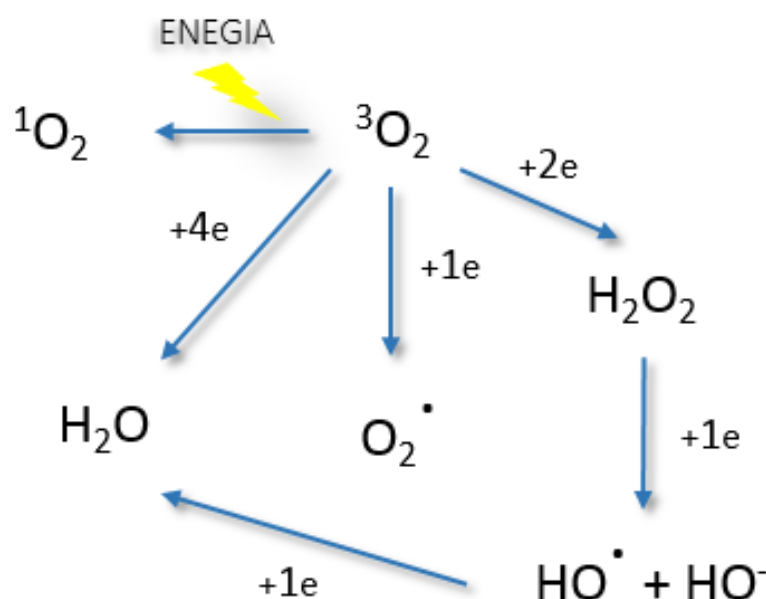


Figura 10: Esquema ilustrativo da formação de ERO. Forte: autora.

Os produtos intermediários gerados a partir da redução parcial do oxigênio são o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o H_2O_2 , o oxigênio *singlet* ($O^{\bullet -}$) e o OH^{\bullet} . Todos estes são denominados ERO, pois são capazes de existir de forma independente (Halliwell, 2006). Estas espécies reativas possuem a capacidade de levar a oxidação de moléculas biológicas, incluindo lipídios, proteínas, glicídios e ácidos nucleicos (Boveris et al., 2006).

Os efeitos danosos que as ERO podem apresentar sobre os organismos aeróbicos podem variar consideravelmente, dependendo da espécie, idade, estado fisiológico e dieta. Os danos também podem se diferenciar dependendo do tipo de tecido em que agirão (Farber et al., 1990; Halliwell e Gutteridge, 2009).

Em função dos inúmeros estudos que vêm sendo realizados para estudar as ERO estas estão, atualmente, sendo muito utilizadas como importantes marcadores intracelulares e estão diretamente envolvidas na regulação redox das células do sistema imunológico (Oktyabrsky e Smirnova, 2007; Halliwell e Gutteridge, 2009).

2.6.3 Estresse nitrosativo

As espécies reativas podem também ser derivadas do nitrogênio, como o NO, que é uma molécula inorgânica que participa de muitos processos fisiológicos e patológicos, sendo um sinalizador ou fator de relaxamento derivado do endotélio. O NO pode ser dividido de acordo com o mecanismo de ação da molécula com sua célula-alvo. Esse mecanismo pode ocorrer de duas formas: quando interage diretamente com a molécula do sistema-alvo e quando existem intermediários que podem reagir com o NO, podendo levar à formação de espécies ativas de nitrogênio (Fang et al., 1997; Diesen e Kuo, 2010).

O NO é sintetizado em diferentes tecidos por meio da conversão da L-arginina em L-citrulina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Podem ocorrer formas constitutivas que são responsáveis pela produção de óxido nítrico neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS), que são essenciais para a integridade vascular, neurotransmissão, processos de defesa do organismo e manutenção de tecidos (Fang et al., 1997; Liaudet et al., 2000). Além disso, existe a forma induzível (iNOS), gerada por macrófagos e outras células ativadas por citocinas. Cada uma das formas possui capacidade de gerar NO por meio de mecanismos regulatórios complementares e distintos. A principal via metabólica do NO envolve sua oxidação rápida a óxidos de nitrogênio superiores: nitrito (NO_2) e nitrato (NO_3) (figura 11) (Diesen e Kuo, 2010; Iwakiri e Kim, 2015).

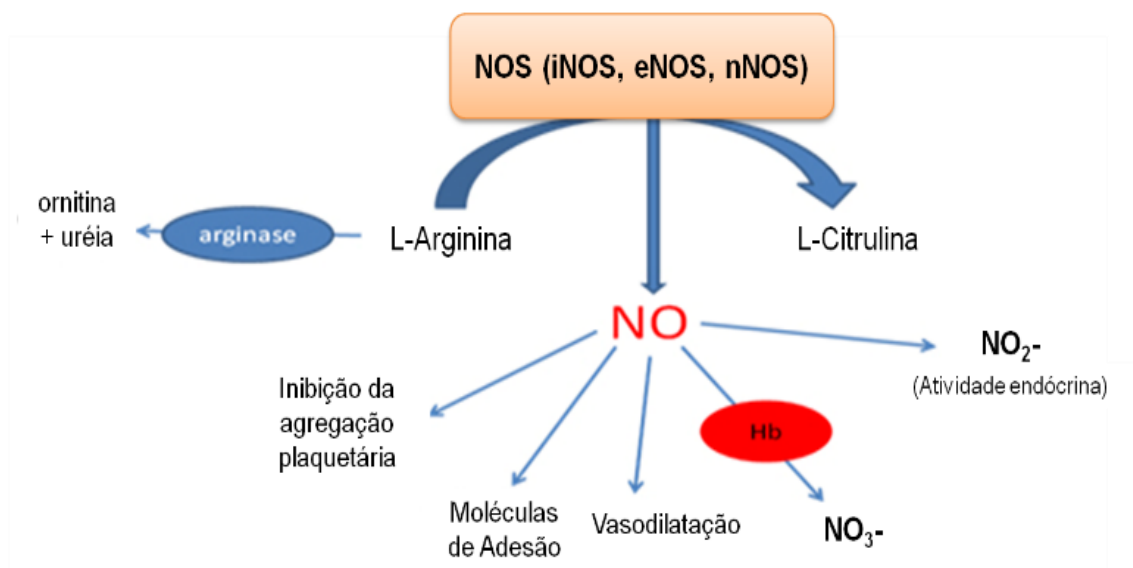


Figura 11: Metabolismo do NO. Fonte: Adaptado (Diesen e Kuo, 2010).

A produção descontrolada de NO pode levar a uma resposta maciça tóxica, implicada em uma série de processos destrutivos teciduais presentes na inflamação aguda ou crônica. Além disso, o $O_2^{\bullet-}$ pode reagir diretamente com o NO formando peroxinitrito ($ONOO^-$), um oxidante bastante lesivo com características semelhantes ao radical hidroxil (Liaudet et al., 2000). A produção exacerbada de ERN é conhecida como estresse nitrosativo. Isso ocorre quando a geração de ERN em algum sistema excede a habilidade do sistema em neutralizá-las e eliminá-las (Villanueva e Giulivi, 2010).

Atualmente, estudos sugerem que o metabolismo oxidativo e nitrosativo anormal pode ter uma grande importância na fisiopatologia de diferentes doenças. Os efeitos prejudiciais decorrentes do EO e EN podem ser pouco expressivos ou muito agressivos, incluindo lipoperoxidação, danos às biomoléculas, agressão às proteínas de membranas e tecidos, às enzimas, carboidratos e dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA) como interrupção do sinal de transdução e mutação podendo levar à morte celular (Soneja et al., 2005).

A geração de ERO e ERN pode ser remediada pela expressão e atividade de diversas enzimas antioxidantes, que são reguladas por uma série de fatores de transcrição, incluindo o fator de transcrição nuclear eritróide 2 (Nrf2) o qual é uma

proteína reguladora de respostas celulares a danos oxidativos que, em condições normais, está mantido no citoplasma associado à proteína Keap1 (*Kelch-like ECH associated protein 1*) (Kaspar et al., 2009; Lu et al., 2016; Fuse e Kobayashi, 2017; Jung et al., 2018; Prestigiacomo e Suter-Dick, 2018).

O Nrf2 desempenha um papel de proteção contra os danos oxidativos induzidos por lesões agudas, estresse nitrosativo e estresse de RE. Após estímulos, como pelo EO, ocorre a perda dessa ligação Keap1/Nrf2 e o fator de transcrição Nrf2 é translocado para o núcleo onde se liga a uma sequência promotora chamada de elemento de resposta antioxidante (ARE) (Jaiswal, 2004; Osburn et al., 2006; Espinosa-Diez et al., 2015; Jung et al., 2018).

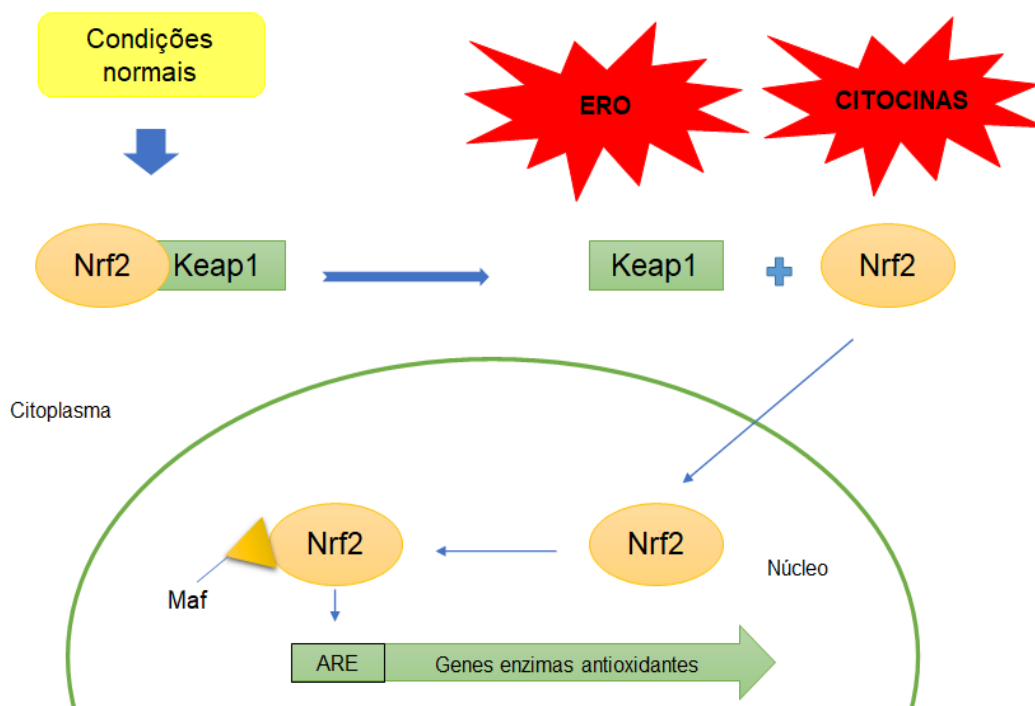


Figura 12: Via do Nrf2. Fonte: Adaptado (Sykiotis et al., 2011).

2.7 Defesas antioxidantes

A geração de RL e/ou ERO proveniente de diversas fontes tornou necessário que os diferentes organismos desenvolvessem um sistema de defesa

com o objetivo de diminuir o desequilíbrio redox e proteger o organismo dos danos potencialmente deletérios que estes apresentam sobre a biologia celular (Cadenas, 1997; Llesuy, 2002; Masella et al., 2005; Soneja et al., 2005; Blair, 2006; Ayala et al., 2014).

O sistema de defesa contra o EO induzido por RL envolve diferentes mecanismos, sendo estes de prevenção, reparo, defesa física e defesa antioxidante (Halliwell e Gutteridge, 2009; Ayala et al., 2014).

Antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, quando comparada àquelas de um substrato oxidável, atrasa significativamente ou impede a oxidação do substrato. Estes compostos têm como função manter os níveis intracelulares de ERO em baixas concentrações e, para isso, agem prevenindo a formação dessas espécies ou combatendo-as uma vez formadas (Repetto e Llesuy, 2002).

2.7.1 Antioxidantes enzimáticos

As defesas antioxidantes enzimáticas encontram-se espalhadas por todo organismo, tanto no meio intracelular como no extracelular. Este sistema de defesa é encarregado da detoxificação de ERO, e é formado por diferentes enzimas, a partir das quais podemos destacar a SOD, a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx), a glutathione S-transferase (GST), entre outras. Cada uma destas atua de forma característica no controle do balanço oxidativo (figura 13) (Llesuy, 2002; Bar-Or et al., 2015).

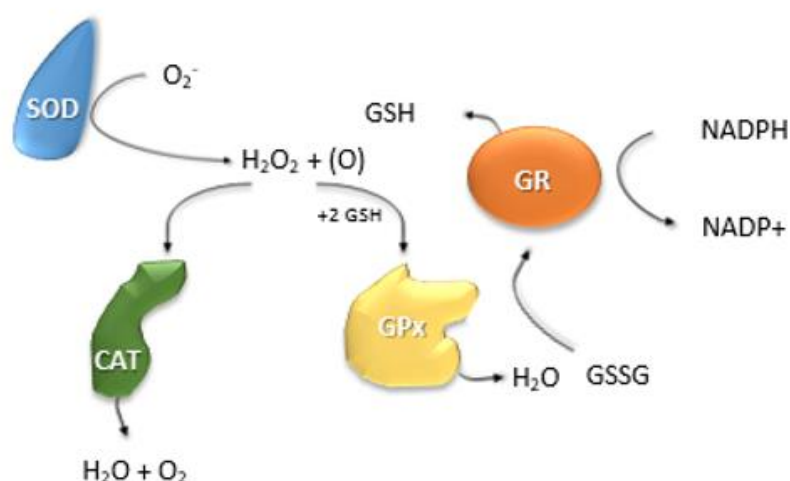
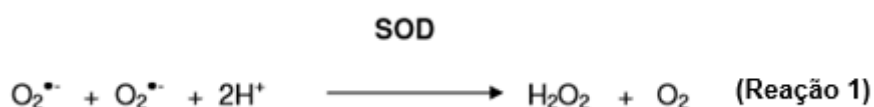


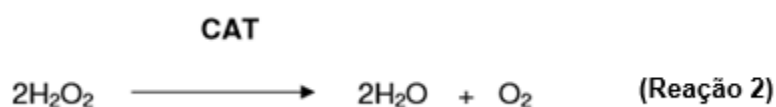
Figura 13: Interação entre enzimas antioxidantes e radicais livres. Forte: modificado (Bona, 2010).

A enzima SOD tem como principal função a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 , sendo o primeiro menos reativo e assim facilmente degradado por outras enzimas (Reação 1) (Masella et al., 2005).



Os produtos finais desta dismutação são o H_2O_2 e o O_2 . O H_2O_2 , apesar de não ser um radical, reage facilmente com outras moléculas, originando o OH^{\bullet} (Harris, 1992).

A remoção dos peróxidos é realizada pelas enzimas CAT e GPx. A CAT possui maior afinidade com os peróxidos de hidrogênio, de metila e etila, apresentando ação sobre o peróxido (Reação 2) (Harris, 1992).



Dentre as peroxidases que normalmente utilizam o grupo heme destaca-se a atividade da GPx, que se localiza no citosol e matriz mitocondrial. Esta catalisa a reação do peróxido de hidrogênio, através da oxidação da glutathiona reduzida. Para restabelecer a glutathiona oxidada (GSSH) à reduzida, é necessário que a glutathiona redutase (GR) promova a regeneração da GSSH, consumindo fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) (figura 14) (Llesuy, 2002; Halliwell, 2006).

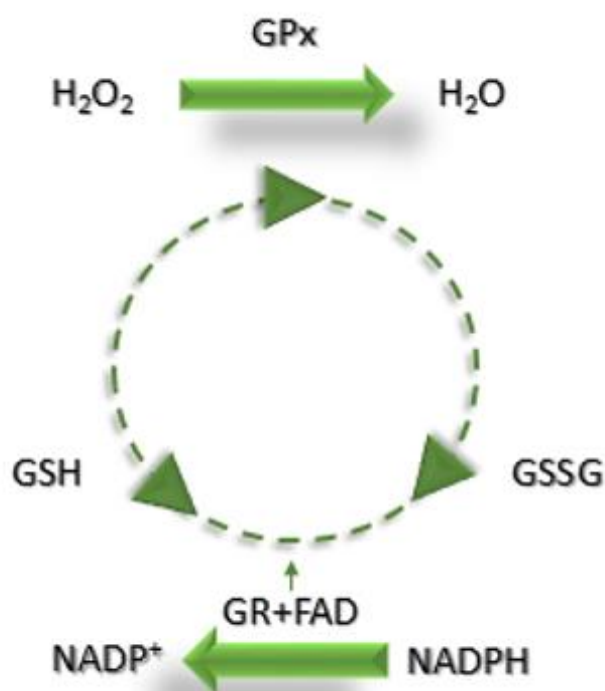


Figura 14: Adaptação do sistema glutathiona. GPx: glutathiona peroxidase; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; H_2O : água; GSH: glutathiona; GSSH: glutathiona oxidada; GR: glutathiona redutase; FAD: flavina-adenina dinucleotídeo; NADP^+ : fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina; NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina reduzido. Fonte: Adaptado (Halliwell, 2006).

2.7.2 Antioxidantes não enzimáticos

Assim como as defesas antioxidantes enzimáticas, que atuam removendo RL ou ERO, impedindo que estes causem danos as membranas celulares,

existem substâncias exógenas que atuam desta mesma forma, impedindo que ocorra uma reação em cadeia com consequente LPO (Halliwell, 1994).

Estas substâncias exógenas são conhecidas como defesas antioxidantes não enzimáticas, sendo as mais conhecidas a glutathione (GSH), o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), os β -carotenos, os flavonoides, entre outros (Sies e Murphy, 1991; Valko et al., 2007).

Os AOX não enzimáticos podem atuar de diferentes formas no combate e prevenção do dano oxidativo, podendo evitar a formação de RL e ERO ou até mesmo suprimindo a cadeia da peroxidação lipídica em sua fase de propagação, reparando ou até mesmo reconstituindo as membranas celulares (Repetto e Llesuy, 2002; Halliwell, 2006).

2.8 Mediadores inflamatórios

A resposta inflamatória é desencadeada por diversos mecanismos com a geração de mediadores inflamatórios que podem ser liberados, desencadeando uma inflamação sistêmica com falência multiorgânica e posteriormente morte (Raghavan et al., 2006). A resposta inflamatória está envolvida na vasodilatação e no estresse oxidativo e nitrosativo potencializando seus efeitos citotóxicos e agravando assim o quadro geral de diferentes patologias. No fígado normal a expressão de mediadores inflamatórios é baixa, estando, entretanto, aumentada nos hepatócitos, nos colangiócitos, no epitélio sinusoidal e nas células inflamatórias em diferentes doenças agudas ou crônicas hepáticas (Cerretani et al., 2011).

As reações inflamatórias são mediadas por peptídeos hidrossolúveis denominados citocinas. Elas constituem uma complexa rede de comunicações entre as células efectoras do sistema imune (Zhang e An, 2007).

2.8.1 Citocinas

O fator de necrose tumoral *alfa* (TNF- α) está entre as principais citocinas envolvidas nos processos inflamatórios e possui alguns efeitos biológicos como a ativação de macrófagos e neutrófilos e aumento das moléculas de adesão envolvidas com o rolamento dos leucócitos, diferenciação celular e apoptose (Aggarwal, 2003; Jiang et al., 2013; Koyama e Brenner, 2017). O TNF- α é produzido principalmente por monócitos, macrófagos, CEH e células de Kupffer, apresentando atividades pró-inflamatórias e efeitos citotóxicos nessas células (Yang e Seki, 2015). No processo de fibrose hepática, o TNF- α desempenha um papel importante na ativação das CEH e na síntese de MEC (Connolly et al., 2009; Bona et al., 2012; Colares et al., 2016).

O TNF- α é induzido por uma série de estímulos que incluem as interleucinas que são um grupo de citocinas inicialmente expressas por leucócitos, mas que posteriormente demonstraram-se ser produzidas por uma ampla variedade de células, como linfócitos, monócitos, macrófagos e células endoteliais (Ren e Torres, 2009; Yang e Seki, 2015).

As ILs têm um papel importante na resposta imunológica, na inflamação e na fibrogênese hepática. A interleucina 1 *beta* (IL-1 β) promove a migração de leucócitos para locais de lesão ou infecção e sua produção normalmente é realizada por monócitos e macrófagos. A sua indução e consequente produção pode levar ao aumento da expressão de moléculas de adesão endotelial e estimulação da produção de interleucina 6 (IL-6), juntamente com o TNF- α (Ren e Torres, 2009; Rock et al., 2010; Cerretani et al., 2011; Jiang et al., 2013).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica envolvida nas vias inflamatórias, hematopoiese e regulação imunológica. Essa citocina pode ser produzida por diferentes células como monócitos, macrófagos e células endoteliais e sua síntese e secreção pode ser induzida durante diferentes condições inflamatórias pela ativação dos receptores *toll-like*, LPS e pelo TNF- α (Ershler e Keller, 2000; Bogdanos et al., 2013). No fígado essa citocina tem sido considerada um importante marcador de quadros graves de inflamação (Bona et al., 2012; Colares

et al., 2016; Koyama e Brenner, 2017; Kubes e Jenne, 2018; Schemitt et al., 2019).

A interleucina 10 (IL-10) pode inibir a produção de várias citocinas, como o TNF- α , IL-1 β e IL-6, em uma variedade de tipos celulares, além de se automodular. A IL-10 pode ser produzida por linfócitos T e B, neutrófilos, macrófagos e células epiteliais e está envolvida na maturação e função de apresentação de antígeno de algumas células apresentadoras de antígenos (APCs). As suas principais ações são consideradas principalmente anti-inflamatórias, inibitórias ou auto-reguladoras, em que a IL-10 parece ser um potente regulador de *feedback* negativo que afeta o controle e a resolução da inflamação por mecanismos autócrinos e parácrinos (Rock et al., 2010; Rong et al., 2018).

2.8.2 Fator de transcrição nuclear *kappa* B

O fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B) desempenha um importante papel em situações normais como na coordenação de respostas imunes adaptáveis, regulando a expressão de muitos mediadores celulares. O NF- κ B está expresso na maioria dos tipos celulares sendo constituído por um dímero composto dos membros da família da Rel. A família do NF- κ B/Rel compreende cinco subunidades, chamadas p50, p52, p65 (RelA), c-Rel e RelB. Geralmente, o NF- κ B consiste em dois polipeptídeos, um de 50 kDa (p50) e um de 65 kDa (p65) (Zingarelli et al., 2003; Espinosa-Diez et al., 2015).

Na homeostase, o NF- κ B mantém-se no citoplasma em sua forma inativa associado com as proteínas inibidoras do sítio κ B chamadas de inibidores κ B (I κ B). O NF- κ B pode ser ativado por uma variedade de sinais relevantes à etiologia e à fisiopatologia inflamatória. Para ocorrer à ativação do NF- κ B são necessários estímulos intracelulares e / ou extracelulares, onde os ativadores podem ser: produtos bacterianos (endotoxinas e peptidoglicanos), vírus e

componentes virais, protozoários, citocinas e RL (Yamaoka et al., 1998; Zingarelli et al., 2003).

A ativação do NF- κ B requer a fosforilação de seus inibidores fisiológicos (particularmente o I κ B α) em resíduos específicos de Serina (Ser-32 e Ser-36). Esta fosforilação é mediada por um complexo proteico. O complexo kinase kappa B (IKKs) é composto de três subunidades, duas unidades catalíticas IKK- α , IKK- β , e uma unidade reguladora IKK γ . Após a fosforilação ocorre a subsequente degradação das I κ Bs através das ubiquitinas, formando um proteossoma 26S. A degradação proteolítica dos I κ Bs permite a translocação do NF- κ B ao núcleo, onde é regulada a expressão de centenas de genes que são importantes à resposta imune inflamatória (figura 15) (Cadenas e Davies, 2000; Siomek, 2012).

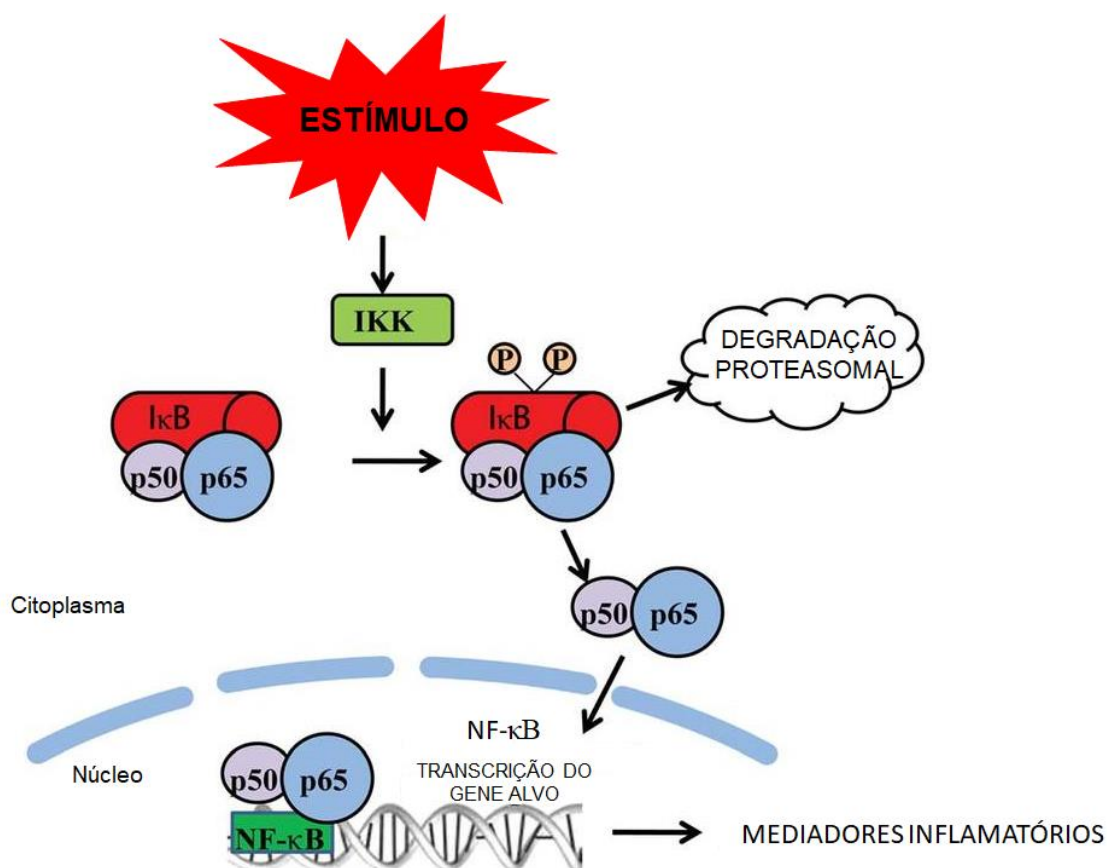


Figura 15: Via de ativação do NF- κ B. Fonte: Adaptado (Siomek, 2012).

2.9 Proteínas de choque térmico

A família das proteínas de choque térmico (HSP) é considerada um grupo de moléculas altamente conservadas, presentes em diferentes espécies e tem como principal função promover o enovelamento correto de outras proteínas. As HSP são classificadas de acordo com seu peso molecular e são divididas em ATP-dependentes como as HSP 100, HSP 90, HSP 70 e HSP 60 e as ATP-independentes que incluem as HSP 27 e HSP 10. Tais proteínas, em condições fisiológicas, estão localizadas em locais distintos dentro da célula, como citoplasma, mitocôndria, retículo endoplasmático (RE) e núcleo (Bozaykut et al., 2014; Jee, 2016; Shehata et al., 2017).

A proteína de choque térmico 70 (HSP 70) é considerada a mais conservada dentro dessa família, sendo encontrada na forma constitutiva e na forma induzível. A HSP 70 vem sendo estudada em diversas enfermidades pelo seu papel na proteção celular contra estímulos nocivos como infecções virais ou bacterianas e EO (Shiota et al., 2010; Liu et al., 2012; Marszalek, 2016; Khandia et al., 2017).

Em condições normais, as HSP estão vinculadas ao fator de choque térmico (HSF), que se encontra inativo no citoplasma. Após algum estímulo, como pelo EO, ocorre a dissociação da ligação do HSF e HSP, resultando na ativação do fator HSF (Jee, 2016; Zininga et al., 2018). A sua forma ativa é fosforilada e ocorre a formação de trímeros de HSF-1 que migram para o núcleo e se ligam à região promotora de elemento de choque térmico (HSE), induzindo a transcrição dos genes das HSPs que mantêm a homeostase do organismo (figura 16) (Bukau et al., 2006; Jee, 2016; Fernández-Fernández et al., 2017).

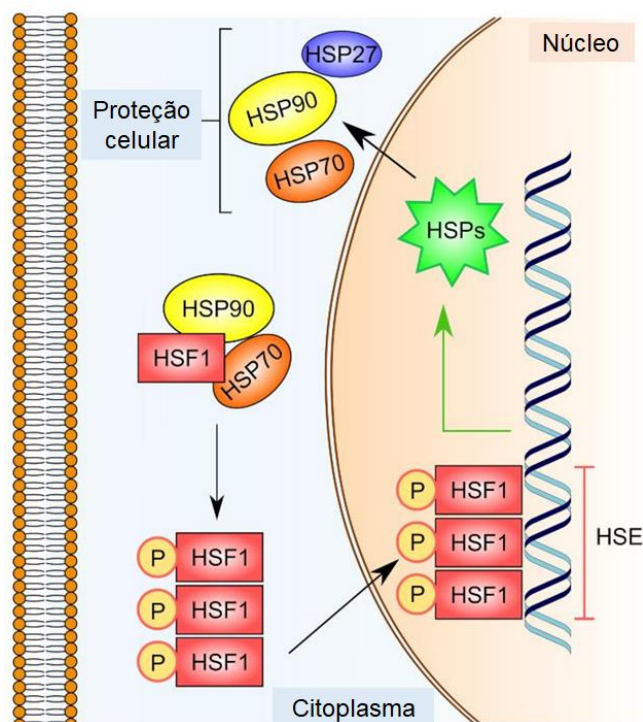


Figura 16: Produção das proteínas de choque térmico. Fonte: Adaptado (Jee, 2016).

2.10 Melatonina

O aumento das EROs / ERNs e a teoria da ativa participação do estresse oxidativo e do estresse do RE na progressão da doença hepática crônica fortalecem as evidências da importância do equilíbrio redox celular, que pode ser alcançado através de uma eficiente barreira antioxidante celular (Sánchez-Valle et al., 2012; Hu et al., 2019).

A melatonina (MLT, N-acetil-5-metoxitriptamina), é um hormônio indolamínico lipofílico sintetizado a partir da serotonina que é proveniente do aminoácido triptofano. Este hormônio foi descoberto em 1958 pelo dermatologista Aaron Lerner e recebeu este nome devido à sua capacidade de contração dos melanóforos de melanócitos de sapos, resultando no clareamento da pele desses animais (Neto e de Castro, 2008).

É produzida na glândula pineal de maneira rítmica, sendo sua produção inibida pela luz, ou seja, sua excreção se dá exclusivamente à noite, iniciando-se

cerca de 2 horas antes do horário habitual de dormir e atingindo seus níveis máximos entre 3 e 4 horas após. Depois de secretada, distribui-se por vários tecidos corporais e não é estocada (Espino et al., 2011; Acuña-Castroviejo et al., 2014).

Conforme podemos observar na figura 17, a MLT é sintetizada a partir da serotonina na seguinte sequência de reações: na fase clara o triptofano é captado do capilar e no pinealócito é convertido pela enzima 5-Hidroxi-triptofano em serotonina; já na fase escura a conversão da serotonina em N-acetil-serotonina é mediada pela enzima N-acetiltransferase; posteriormente a N-acetil-serotonina é convertida em MLT pela ação da enzima Hidroxindol-O-metiltransferase (Neto e de Castro, 2008).

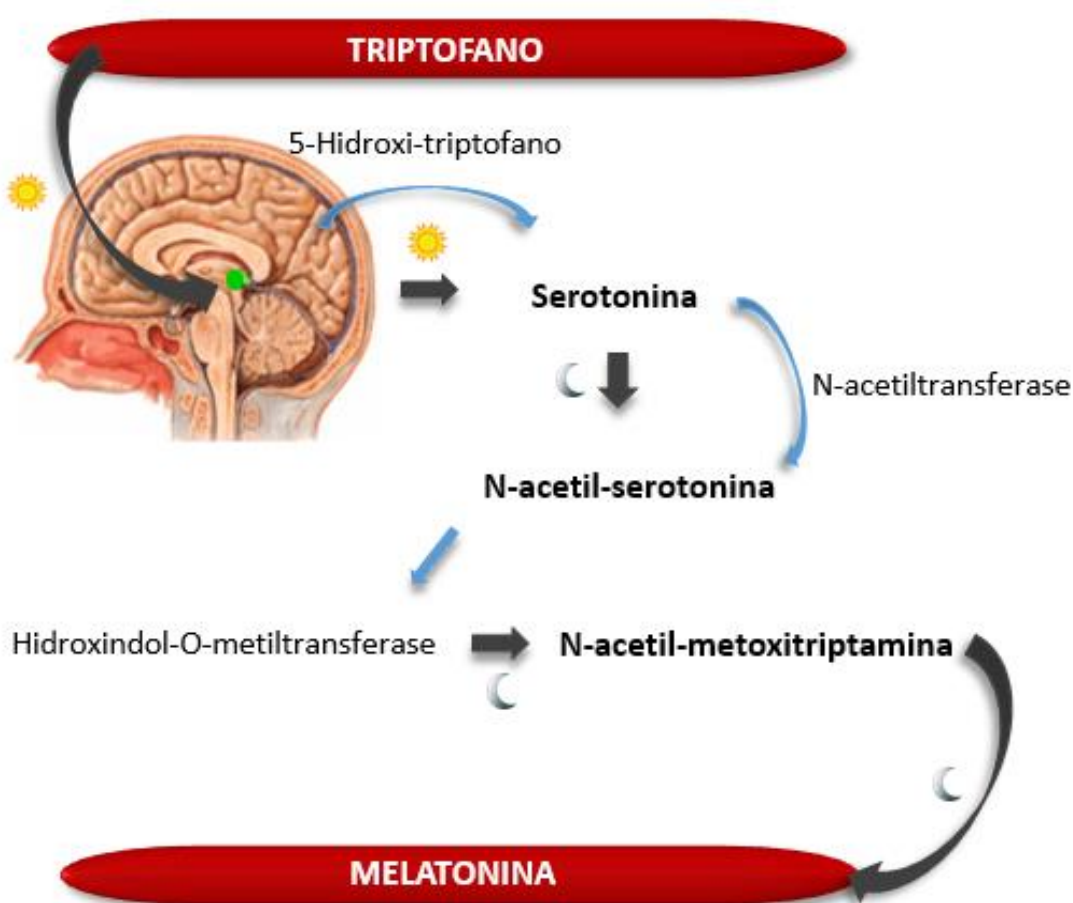


Figura 17: Biossíntese da melatonina. Fonte: autora.

A MLT é caracterizada por sua alta solubilidade em lipídeos, o que facilita sua passagem através das membranas celulares, atravessando, inclusive, a barreira hematoencefálica. Sua estrutura química apresenta grupamentos metoxi no carbono 5 e acetil ligado ao nitrogênio do grupo amina (conferindo afinidade a molécula); ainda os carbonos 2 e 3 do anel pirrólico apresentam capacidade redutora, tornando-a um potente antioxidante (figura 18) (Claustrat et al., 2005; Turati, 2013; Ramis et al., 2015).

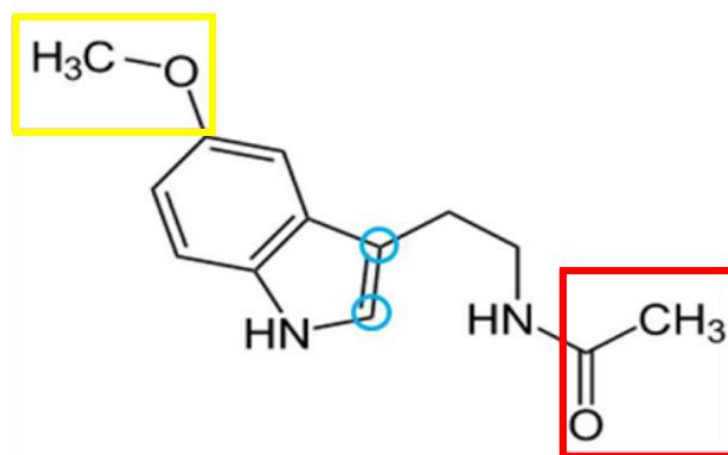


Figura 18: Estrutura química da melatonina. No quadro amarelo está destacado o grupamento metoxi. No quadro vermelho o grupamento acetil. Os círculos azuis indicam os carbonos 2 e 3, constituintes do anel pirrólico. Fonte: Adaptado (Turati, 2013).

Encontra-se presente em praticamente todos os fluidos biológicos, incluindo líquido, fluido amniótico e leite materno (Acuña-Castroviejo et al., 2014). Por apresentar alta solubilidade em lipídeos, no sangue encontra-se em até 70% ligada à albumina, facilitando assim, após a sua secreção, atravessar as membranas celulares, incluindo a barreira hematoencefálica e a placenta, e se distribuindo-se assim por tecidos variados (Partridge e Mietus, 1980).

Sua metabolização ocorre principalmente no fígado, que depura cerca de 90% de seus níveis circulantes, tendo como principal metabólito formado a 6-sulfatoximelatonina, excretada na urina humana cujos níveis refletem a atividade da glândula pineal (Reiter et al., 2000).

A MLT também se encontra presente em alimentos como gergelim branco, girassol e soja, podendo o consumo destes suprir parte das deficiências diárias de síntese do hormônio (Sangsopha et al., 2020). Assim como em humanos, nas plantas, a produção de MLT ocorre a partir do aminoácido triptofano sendo desencadeada em resposta aos fatores abióticos geradores de estresse (Wei et al., 2015).

Apesar do hormônio estar diretamente associado aos ritmos circadiano e sazonal atribuindo a esta função cronobiológica, como sinalizadora do ritmo biológico e variações ambientais, também pode apresentar efeitos não-cronobiológicos (Neto e de Castro 2008). Estudos vêm demonstrando sua capacidade de atuar nos sistemas de defesa do organismo, direta ou indiretamente, como antioxidante e anti-inflamatório em diferentes condições fisiopatológicas (Carrillo-Vico et al., 2005; Zhang et al., 2017; Hardeland, 2019). Podendo atuar na modulação da produção de moléculas pró-inflamatórias através da regulação de vários fatores de transcrição, incluindo o NF- κ B e Nrf2 (Mauriz et al., 2013; Vriend e Reiter et al., 2015; Tordjman et al., 2017).

Hardeland e colaboradores (2011), associam dois receptores específicos (MT1 e MT2), ambos acoplados à proteína G e presentes em tecidos como retina, fígado, timo e trato gastrointestinal, aos efeitos biológicos da MLT. Receptores de MLT também são encontrados em linfócitos, monócitos e neutrófilos, indicando a atividade imunomoduladora associada à ativação, migração e produção de citocinas por linfócitos (Pedrosa et al., 2010).

Em 2015, Pi e colaboradores descreveram o efeito hepatoprotetor do hormônio após observarem o aumento da atividade da proteína SIRT3 e da acetilação da SOD2 induzida pelo cádmio. A administração oral de MLT também influenciou positivamente disfunções hepáticas mitocondriais reduzindo a esteatose hepática em ratos diabéticos obesos (Agil et al., 2015).

Elevação dos níveis da enzima iNOS foram relacionados a diminuição dos níveis endógenos de MLT e expressão de seus receptores (Singh e Jadhav, 2014). Na modulação pró-inflamatória, a MLT mostrou-se eficaz na redução dos

níveis iNOS e de NO, ativação do NF- κ B e inibição do Nrf2, em modelo experimental de estresse oxidativo em células gliais induzido por metanfetamina (Jumnongprakhon et al., 2015).

Ratos Sprague-Dawley tratados com MLT apresentaram redução da lipoperoxidação evidenciada pela manutenção dos níveis da enzima antioxidante SOD, do fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas (IL-1 β , IL-6) e do mediador pró-inflamatório iNOS (Liu et al., 2012).

A capacidade redox da MLT está associada à presença de um sistema de anel aromático rico em elétrons que permite que o hormônio funcione como doador de elétrons (Poeggeler et al., 1994). Estudos vêm demonstrando propriedades antioxidantes da MLT em diferentes modelos experimentais. Sokolovic et al. (2015), registraram o efeito antioxidante da MLT aliado à redução da fragmentação do material genético observado em testículos de ratos. No fígado de ratos expostos ao tetracloreto de carbono, a MLT promoveu a interrupção do metabolismo das espécies reativas de oxigênio (Ohta et al., 2003).

Apesar dos inúmeros estudos evidenciando as propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, imunomoduladoras e associadas à resistência à insulina da MLT, a compreensão do mecanismo de ação desta na prevenção e reversão de danos celulares é limitada (Macchi e Bruce, 2004; Bona et al., 2012; Czechowska et al., 2015; Moreira et al., 2015; Colares et al., 2016; Lebda et al., 2018; Ostjen et al., 2019).

Tendo em vista essas considerações, analisamos a ação da MLT no fígado dos animais submetidos ao modelo de ligadura de ducto biliar (LDB), avaliando a atuação da mesma em processos como: estresse oxidativo, nitrosativo, dano tecidual e processo inflamatório.

3 MARCO CONCEITUAL

Diversos estudos indicam que o estresse oxidativo está intimamente associado à lesão celular hepática decorrente da cirrose biliar secundária visto que a lipoperoxidação exerce um papel importante na fisiopatogenia da doença. O desequilíbrio no balanço redox decorrente da produção de ERO atua potencializando o dano hepático a partir de sua influência sobre os processos inflamatório e de morte hepatocelular. Neste trabalho, iremos abordar as questões envolvidas no processo oxidativo e inflamatório decorrentes do modelo de cirrose biliar secundária induzida pela cirurgia de LDB, bem como alterações estruturais, deposição de colágeno e proteínas de choque térmico avaliando os possíveis efeitos da melatonina neste modelo experimental (figura 19).

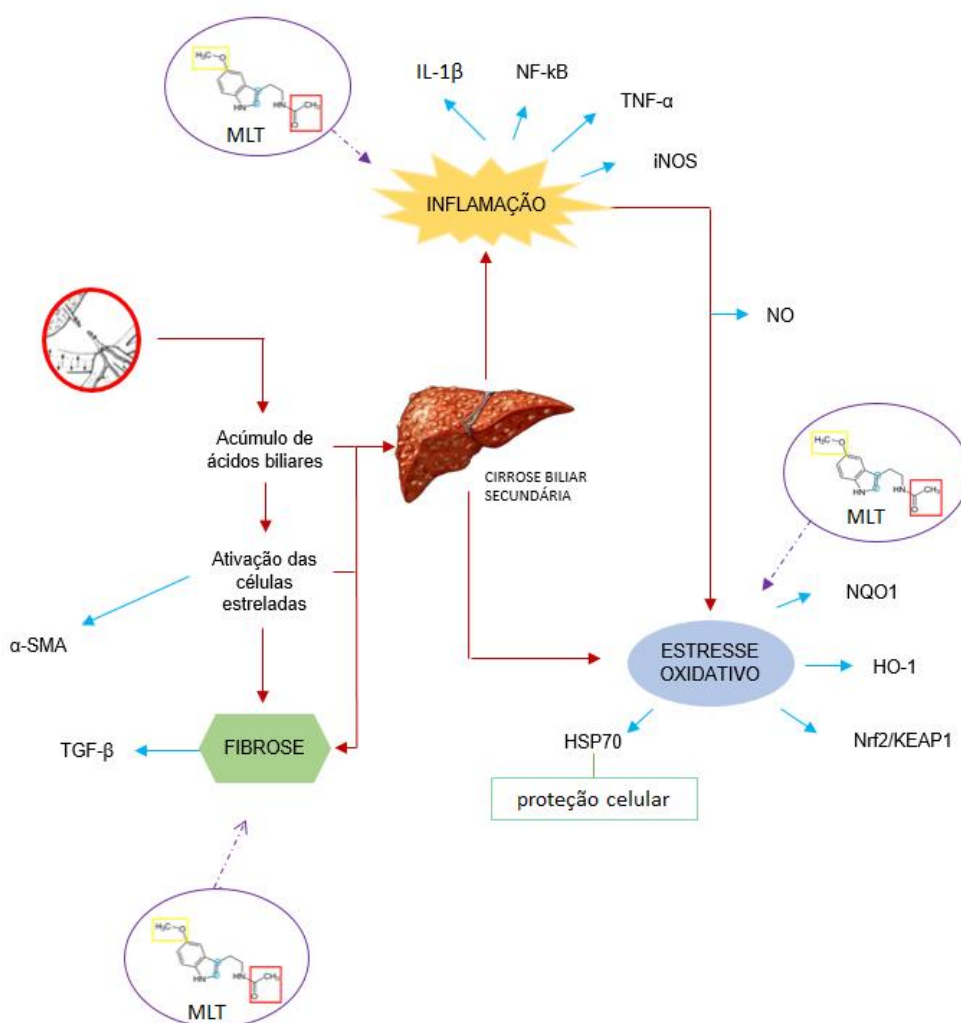


Figura 19: Marco teórico esquemático do estudo.

4 JUSTIFICATIVA

A cirrose hepática é uma doença crônica progressiva que ocorre como resultado da cicatrização e regeneração hepatocelular. Representa um estado de disfunção hepática na maioria das vezes irreversível e caracterizado pela formação de septos e nódulos fibróticos.

Levando-se em conta os altos índices de pacientes cirróticos e as inúmeras complicações decorrentes da doença, faz-se necessário a utilização de novos tratamentos, mais precoces e eficazes, a fim de controlar ou retardar a doença e assim melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Procedimentos com seres humanos para o estudo da cirrose hepática são limitados por considerações éticas, reforçando assim a necessidade de modelos animais que reproduzam a cirrose. O modelo experimental de cirrose biliar secundária apresenta uma grande reprodutibilidade e é amplamente utilizado para o estudo dos processos patológicos decorrentes da doença, bem como para o estudo de novas alternativas de tratamento.

A utilização da melatonina baseia-se em trabalhos do grupo de pesquisa no qual o estudo foi desenvolvido, sendo utilizada em função de seus efeitos benéficos já observados em diferentes modelos experimentais. Assim, pretendemos com o presente estudo avaliar os possíveis marcadores biológicos e mecanismos envolvidos no processo da doença, investigando as alterações no tecido hepático, frente ao uso de melatonina na tentativa de prevenir e/ou retardar o desenvolvimento da doença.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da MLT sobre o tecido hepático de ratos Wistar com cirrose biliar secundária, induzida pelo modelo experimental de ligadura de ducto biliar.

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Objetivos específicos do Artigo I

Respondidos no artigo intitulado, *“Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation”*.

Publicado na revista *World Journal of Gastroenterology* (2016).

- Observar as alterações decorrentes da cirrose a partir da quantificação das enzimas de integridade hepática aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA);
- Verificar alterações hepáticas e esplênicas a partir da avaliação da relação hepatossomática e esplenossomática;
- Verificar a fibrose hepática a partir da observação de características histológicas após coloração de picrossírius dos controles e tratados com melatonina;
- Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo, mediante avaliação da LPO no tecido hepático através das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a atividade das enzimas AOX SOD, CAT, GPx e GST;

- Determinar os níveis de GSH no fígado dos animais;
- Verificar as características histológicas da cirrose no fígado através de coloração de hematoxilina e eosina (HE) e o processo inflamatório através da expressão imunohistoquímica das proteínas TNF- α e iNOS.

5.2.2 Objetivos específicos do Artigo II:

Respondidos no artigo intitulado, “Protective action of Melatonin in rats with secondary biliary cirrhosis”.

Enviado para a revista *World Journal of Gastroenterology*.

- Avaliar a integridade hepática e consequente estabelecimento da doença através da análise sérica das enzimas AST, ALT e FA;
- Analisar as alterações histológicas no fígado (HE e MEV);
- Analisar os níveis de LPO no fígado através da técnica de TBARS;
- Determinar os níveis de proteína total e atividade da enzima antioxidante SOD no fígado;
- Avaliar os níveis dos metabólitos do óxido nítrico no fígado pela técnica de nitritos e nitratos;
- Avaliar os danos ao DNA pelo ensaio cometa e teste de micronúcleos;
- Quantificar os níveis da citocina IL-1 β no fígado;
- Analisar e quantificar a expressão do NF- κ B, Nrf2, NQO1 e HSP 70 no fígado pela técnica de imuno-histoquímica e/ou *western blot*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ. Cell Mol Life Sci. 2014;71(16):2997-3025.
- Agil A, El-Hammadi M, Jimenez-Aranda A, Tassi M, Abdo W, Fernandez-Vazquez G, Reiter RJ. Melatonin reduces hepatic mitochondrial dysfunction in diabetic obese rats. J Pineal Res. 2015;59:70-9.
- Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat Rev Immunol. 2003;3(9):745-56.
- Ayala A, Muñoz M, Argüeles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxid Med Cell Longev. 2014;2014:360438.
- Aydın MM, Akçalı KC. Liver fibrosis. Turk J Gastroenterol. 2018;29(1):14-21.
- Baldo G, Kretzmann NA, Tieppo J, Filho GP, Cruz CU, Meurer L, Silveira TR, Santos JL, Marroni CA, Marroni NP, Giugliani R, Matte U. Bone Marrow Cells Reduce Collagen Deposition in the Rat Model of Common Bile Duct Ligation. J Cell Sci Ther. 2011;2:112.
- Barnett R. Liver cirrhosis. Lancet. 2018;392(10144):275.
- Bar-Or D, Bar-Or R, Rael LT, Brody EN. Oxidative stress in severe acute illness. Redox Biology. 2015;4:340-5.
- Barp J, Araújo AS, Fernandes TR, Rigatto KV, Llesuy S, Belló-Klein A, Singal P. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. Braz J of Med and Bio Res. 2002;35(9):1075-81.
- Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. J Hepatol. 2013;58(3):593-608.
- Blair IA. Endogenous glutathione adducts. Curr Drug Metab. 2006;7(8):853-72.
- Bogdanos DP, Gao B, Gershwin ME. Liver immunology. Compr Physiol. 2013;3(2):567-98.
- Bona S. Proteção antioxidante da quercetina em fígado de ratos cirróticos. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010.
- Bona S, Filippin LI, Di Naso FC, de David C, Valiatti B, Isoppo Schaun M, Xavier RM, Marroni NP. Effect of antioxidant treatment on fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. ISRN Gastroenterol. 2012;2012:762920.
- Bosco AD, Schedler FB, Colares JR, Schemitt EG, Hartmann RM, Forgiarini Junior LA, Dias AS, Marroni NP. Melatonin effects on pulmonary tissue in the experimental model of Hepatopulmonary Syndrome. J Bras Pneumol. 2019;45(3):e20170164.
- Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. Biochem J. 1973;134:707-16.

Boveris A, Valdez LB, Zaobornyj T, Bustamante J. Mitochondrial metabolic states regulate nitric oxide and hydrogen peroxide diffusion to the cytosol. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757(5-6):535-42.

Bozaykut P, Ozer NK, Karademir B. Regulation of protein turnover by heat shock proteins. *Free Radic Biol Med*. 2014;77:195-209.

Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med*. 1997;336(3):186-95.

Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*. 2006;125(3):443-51.

Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *BioFactors*. 1997;6(4):391-7.

Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(3-4):222-30.

Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*. 2005;27(2):189-200.

Cerretani D, Bello S, Cantatore S, Fiaschi AI, Montefrancesco G, Neri M, Pomara C, Riezzo I, Fiore C, Bonsignore A, Turillazzi E, Fineschi V. Acute administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) induces oxidative stress, lipoperoxidation and TNF α -mediated apoptosis in rat liver. *Pharmacol Res*. 2011;64(5):517-27.

Chang SW, Ohara N. Increased pulmonary vascular permeability in rats with biliary cirrhosis: role of thromboxane A₂. *Am J Physiol*. 1993;264(3):245-52.

Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev*. 2005;9(1):11-24.

Coelho JCU. *Aparelho Digestivo – Clínica e Cirurgia*. 4^a ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2012.

Colares JR, Schemitt EG, Hartmann RM, Licks F, Soares MC, Bosco AD, Marroni NP. Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation. *World J Gastroenterol*. 2016;22(40):8918-28.

Conn H, Atterbury C. Cirrhosis. In: Schiff L, Schiff E, editors. *Diseases of the Liver*. 7th edition Lippencott Company, Philadelphia; Philadelphia: 1993;875-934.

Connolly MK, Bedrosian AS, Mallen-St Clair J, Mitchell AP, Ibrahim J, Stroud A, Pachter HL, Bar-Sagi D, Frey AB, Miller G. In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation in mice via TNF- α . *J Clin Invest*. 2009;119(11):3213-25.

Crismale JF, Friedman SL. Acute liver injury and decompensated cirrhosis. *Med Clin North Am*. 2020;104(4):647-62.

Czechowska G, Celinski K, Korolczuk A, Wojcicka G, Dudka J, Bojarska A, Reiter RJ. Protective effects of melatonin against thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *J Physiol Pharmacol*. 2015;66(4):567-79.

Dewidar B, Meyer C, Dooley S, Meindl-Beinker AN. TGF- β in Hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis-updated 2019. *Cells*. 2019;8(11):1419.

- Dhaliwal A, Towey J, Lord JM, Armstrong M, Elsharkawy AM. Nutrition in liver cirrhosis: a case-based overview. *Frontline Gastroenterology*. 2020;11:155-61.
- Diesen DL, Kuo PC. Nitric oxide and redox regulation in the liver: Part I. General considerations and redox biology in hepatitis. *J Surg Res*. 2010;162(1):95-109.
- Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis*. 2005;10(5):927-39.
- Ershler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med*. 2000;51:245-70.
- Espino J, Pariente J, Rodriguez AB. Role of melatonin on diabetes-related metabolic disorders. *World J Diabetes*. 2011;2(6):82-91.
- Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, Lamas S. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol*. 2015;6:183-97.
- Fang S, Sharma RV, Bhalla RC. Endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits platelet-derived growth factor-BB stimulated focal adhesion kinase and paxillin phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236(3):706-11.
- Farber JL, Kyle ME, Coleman JB. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest*. 1990;62(6):670-9.
- Fernandes A, Mies S. Hipertensão portal. In: Robe (ed). *Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia*. São Paulo: Silva OC, Zucoloto S, 1998.
- Fernandes SA, Bassani L, Nunes FF, Aydos ME, Alves AV, Marroni CA. Nutritional assessment in patients with cirrhosis. *Arq Gastroenterol*. 2012;49(1):19-27.
- Fernández-Fernández MR, Gragera M, Ochoa-Ibarrola L, Quintana-Gallardo L, Valpuesta JM. Hsp70 - a master regulator in protein degradation. *FEBS Lett*. 2017;591(17):2648-60.
- Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134:1655-69.
- Friedman SL, Arthur MJ. Reversing hepatic fibrosis. *Sci Med*. 2002;8(4):194-205.
- Fuse Y, Kobayashi M. Conservation of the Keap1-Nrf2 System: An Evolutionary Journey through Stressful Space and Time. *Molecules*. 2017;22(3):436.
- Gerschman R, Gilbert D, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*. 1954;119(3097):623-6.
- Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994;344(8924):721-4.
- Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*. 2006;141(2):312-22.
- Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. New York: Oxford University Press Inc; 2009.

Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol*. 2011;93:350-84.

Hardeland R. Aging, melatonin, and the pro- and anti-inflammatory networks. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5). pii: E1223.

Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J*. 1992;6(9):2675-83.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;11(3):298-300.

Hernaez R, Solà E, Moreau R, Ginès P. Acute-on-chronic liver failure: an update. *Gut*. 2017;66(3):541-53.

Hu C, Zhao L, Tao J, Li L. Protective role of melatonin in early-stage and end-stage liver cirrhosis. *J Cell Mol Med*. 2019;23(11):7151-62.

Iwakiri Y, Kim MY. Nitric oxide in liver diseases. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(8):524-36.

Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med*. 2004;36(10):1199-207.

Jansen PL, Ghallab A, Vartak N, Reif R, Schaap FG, Hampe J, Hengstler JG. The ascending pathophysiology of cholestatic liver disease. *Hepatology*. 2017;65(2):722-38.

Jee H. Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review. *J Exerc Rehabil*. 2016;12(4):255-9.

Jiang JX, Chen X, Fukada H, Serizawa N, Devaraj S, Török NJ. Advanced glycation endproducts induce fibrogenic activity in nonalcoholic steatohepatitis by modulating TNF- α -converting enzyme activity in mice. *Hepatology*. 2013;58(4):1339-48.

Jumnongprakhon P, Govitrapong P, Tocharus C, Pinkaew D, Tocharus J. Melatonin protects methamphetamine-induced neuroinflammation through NF- κ B and Nrf2 pathways in glioma cell line. *Neurochemical Research*. 2015;40:1448-56.

Jung BJ, Yoo HS, Shin S, Park YJ, Jeon SM. Dysregulation of NRF2 in Cancer: from Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Biomol Ther (Seoul)*. 2018;26(1):57-68.

Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(9):1304-9.

Khandia R, Munjal AK, Iqbal HMN, Dhama K. Heat shock proteins: therapeutic perspectives in inflammatory disorders. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2017;10(2):94-104.

Kim RG, Loomba R, Prokop LJ, Singh S. Statin use and risk of cirrhosis and related complications in patients with chronic liver diseases: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017;15(10):1521-30.

Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol*. 1984;65(3):305-11.

- Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. *J Clin Invest*. 2017;127(1):55-64.
- Kubes P, Jenne C. Immune Responses in the Liver. *Annu Rev Immunol*. 2018;36:247-77.
- Lebda MA, Sadek KM, Abouzed TK, Tohamy HG, El-Sayed YS. Melatonin mitigates thioacetamide-induced hepatic fibrosis via antioxidant activity and modulation of proinflammatory cytokines and fibrogenic genes. *Life Sci*. 2018;192:136-43.
- Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut*. 2015;64(5):830-41.
- Liaudet L, Soriano FG, Szabo C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med*. 2000;28(4):37-52.
- Liu T, Daniels CK, Cao S. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacol Ther*. 2012;136(3):354-74.
- Llesuy SF. Introducción y especies activas de oxígeno. In: ULBRA (ed). *Estresse Oxidativo e Antioxidantes*. Canoas: Marroni NP (org). 2002;21-32.
- López-Sánchez GN, Domínguez-Pérez M, Uribe M, Nuño-Lámbarri N. The fibrogenic process and the unleashing of acute-on-chronic liver failure. *Clin Mol Hepatol*. 2020;26(1):7-15.
- Lu MC, Ji JA, Jiang ZY, You QD. The Keap1-Nrf2-ARE pathway as a potential preventive and therapeutic target: an update. *Med Res Rev*. 2016;36(5):924-63.
- Lurie Y, Webb M, Cytter-Kuint R, Shteingart S, Lederkremer GZ. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2015;21(41):11567-83.
- Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*. 2004;25(3):177-95.
- Marszalek J. [Mitochondrial Hsp70 - function and evolution]. *Postepy Biochem*. 2016;62(2):69-76.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*. 2005;16(10):577-86.
- Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recente insights and new perspectives. *J Pineal Res*. 2013;54(1):1-14.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969;244(22):6049-55.
- Mittal CK, Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3', 5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci*. 1977;74(10):4360-4.

Moreira AJ, Ordoñez R, Cerski CT, Picada JN, García-Palomo A, Marroni NP, Mauriz JL, González-Gallego J. Melatonin activates endoplasmic reticulum stress and apoptosis in rats with diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144517.

Netter FH. Atlas de anatomia humana, 6ªed, Elsevier Editora Ltda, Rio de Janeiro, 2015.

Neto JAS, de Castro BF. Melatonina, ritmos biológicos e sono-uma revisão da literatura. *Rev Bras Neurol*. 2008;44(1):5-11.

Ohta Y, Nishimura MK, Matsura T, Yamada K, Kitagawa A, Kishikawa T. Melatonin prevents disruption of hepatic reactive oxygen species metabolism in rats treated with carbon tetrachloride. *J Pineal Res*. 2003;36:10-17.

Oktyabrsky ON, Smirnova GV. Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry (Moscow)*. Issue. 2007;72(2):132-45.

Orellana M, Rodrigo R, Thielemann L. Bile duct ligation and oxidative stress in the rat: effects in liver and kidney. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2000;126(2):105-11.

Osburn WO, Wakabayashi N, Misra V, Nilles T, Biswal S, Trush MA, Kensler TW. Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion. *Arch Biochem Biophys*. 2006;454(1):7-15.

Ostjen CA, Rosa CGS, Hartmann RM, Schemitt EG, Colares JR, Marroni NP. Anti-inflammatory and antioxidant effect of melatonin on recovery from muscular trauma induced in rats. *Exp Mol Pathol*. 2019;106:52-9.

Parola M, Leonarduzzi G, Robino G, Albano E, Poli G, Dianzani MU. On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Rad Biol Med*. 1996;20(3):351-9.

Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Mol Aspects Med*. 2019;65:37-55.

Partridge WM, Mietus LJ. Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain walls. *J Neurochem*. 1980;34:1761-3.

Pastor A, Collado PS, Almar M, González-Gallego J. Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *J Hepatol*. 1997;27(2):363-70.

Patton KT, Thibodeau GA. *The Human Body in Health & Disease*. 6ª ed. Elsevier Health Sci, 2013.

Pedrosa AMC, Weinlich R, Mognol GP, Robbs BK, Viola GPB, Campa A, Amarante-Mendes GP. Melatonin protects cd4+ t cells from activation-induced cell death by blocking nfat-mediated cd95 ligand upregulation. *J Immunol*. 2010;184(7):3487-94.

Peres W, Tuñón MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, González-Gallego J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol*. 2000;33(5):742-50.

Pi H, Xu S, Reiter RJ, Guo P, Zhang L, Li Y, Li M, Cao Z, Tian L, Xie J, Zhang T, He M, Lu H, Liu C, Duan W, Yu Z, Zhou Z. SIRT3-SOD2-mROS-dependent autophagy in cadmium-induced hepatotoxicity and salvage by melatonin. 2015;1037-51.

Poeggeler G, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, Barlow-Walden LR. Melatonin – a highly potent endogenous scavenger and electron donor: New aspects of the oxidation chemistry of this indole assessed in vitro. *Ann NY Acad Sci.* 1994;738:419-20.

Portugal FB, Campos MR, de Carvalho JR, Flor LS, Schramm JMA, Costa MFS. Disease burden in Brazil: an investigation into alcohol and non-viral cirrhosis. *Ciênc Saúde Coletiva.* 2015;20(2):491-501.

Prestigiacomo V, Suter-Dick L. Nrf2 protects stellate cells from Smad-dependent cell activation. *PLoS One.* 2018;13(7):e0201044.

Raghavan R, Brady ML, Rodríguez-Ponce MI, Hartlep A, Pedain C, Sampson JH. Convection-enhanced delivery of therapeutics for brain disease, and its optimization. *Neurosurg Focus.* 2006;20(4):E12.

Ramis MR, Esteban S, Miralles A, Tan DX, Reiter RJ. Protective effects of melatonin and mitochondria-targeted antioxidants against oxidative stress: a review. *Curr Med Chem.* 2015;22(22):2690-711.

Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:376-86.

Ren K, Torres R. Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. *Brain Res Rev.* 2009;60(1):57-64.

Repetto MG, Llesuy SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35(5):523-34.

Rezaei A, Ardestani SK, Forouzandeh M, Tavangar SM, Khorramizadeh MR, Payabvash S, Nezami BG, Jahanshiri Z, Tavakoli Z, Shariftabrizi A, Dehpour AR. The effects of N-acetylcysteine on the expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in hepatic fibrosis in bile duct ligated rats. *Res Hepatol.* 2008;38(12):1252-63.

Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:321-42.

Rong YD, Bian AL, Hu HY, Ma Y, Zhou XZ. Study on relationship between elderly sarcopenia and inflammatory cytokine IL-6, anti-inflammatory cytokine IL-10. *BMC Geriatr.* 2018;18(1):308.

Sánchez-Valle V, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr Med Chem.* 2012;19(28):4850-60.

Sangsopha J, Johns NP, Johns J, Moongngarm A. Dietary sources of melatonin and benefits from production of high melatonin pasteurized milk. *J Food Sci Technol.* 2020;57:2026-37. doi: 10.1007 /s13197-020-04236-5.

Schemitt EG, Hartmann RM, Colares JR, Licks F, Salvi JO, Marroni CA, Marroni NP. Protective action of glutamine in rats with severe acute liver failure. *World J Hepatol.* 2019;11(3):273-86.

Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet.* 2008;371(9615):838-51.

Schwartz JM, Reinus JF. Prevalence and natural history of alcoholic liver disease. *Clinics in liver disease.* 2012;16(4):659-66.

Shehata RH, Abdelmoneim SS, Osman OA, Hasanain AF, Osama A, Abdelmoneim SS, Toraih EA. Deregulation of miR-34a and its chaperon hsp70 in hepatitis c virus-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(9):2395-401.

Shiota M, Kusakabe H, Izumi Y, Hikita Y, Nakao T, Funae Y, Miura K, Iwao H. Heat shock cognate protein 70 is essential for Akt signaling in endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(3):491-7.

Sies H, Murphy ME. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol B.* 1991;8(2):211-8.

Silva A, D'albuquerque L. *Hepatologia clínica e cirúrgica.* São Paulo: Sarvier; 1986.

Singh M, Jadhav HR. Melatonin: Functions and ligands. *Drug Discov.* 2014;19:1410-8.

Singh S, Shackleton G, Ah-Sing E, Chakraborty J, Bailey ME. Antioxidant defenses in the duct-ligated rat. *Gastroenterology.* 1992;103(5):1625-9.

Siomek A. NF- κ B signaling pathway and free radical impact. *Acta Biochim Pol.* 2012;59(3):323-31.

Smith A, Baumgartner K, Bositis C. Cirrhosis: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician.* 2019;100(12):759-70.

Soneja A, Drews M, Malinski T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Rep.* 2005;57:108-19.

Sokolovic D, Djordjevic B, Kocic B, Stoimenov TJ, Stanojkovic Z, Sokolovic DM, Veljkovic A, Ristic G, Despotovic M, Milisavljevic D, Jankovic R, Binic I. The Effects of Melatonin on Oxidative Stress Parameters and DNA Fragmentation in Testicular Tissue of Rats Exposed to Microwave Radiation. *Adv Clin Exp Med.* 2015;24(3):429-36.

Strauss O, Dunbar PR, Bartlett A. The immunophenotype of antigen presenting cells of the mononuclear phagocyte system in normal human liver – A systematic review. *Hepatology.* 2015;62(2):458-68.

Syktotis GP, Habeos IG, Samuelson AV, Bohmann D. The role of the antioxidant and longevity-promoting Nrf2 pathway in metabolic regulation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011;14(1):41-8.

Teh SH, Nagorney DM, Stevens SR, Offord KP, Therneau TM, Plevak DJ, Talwalkar JA, Kim WR, Kamath OS. Risk factors for mortality after surgery in patients with cirrhosis. *Gastroenterology.* 2007;132(4):1261-9.

Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Marroni CA, Marroni N. Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress. *Arq Gastroenterol*. 2005;42(4):244-8.

Tieppo J, Cuevas MJ, Vercelino R, Tuñón MJ, Marroni NP, González-Gallego J. Quercetin administration ameliorates pulmonary complications of cirrhosis in rats. *J Nutr*. 2009;139(7):1339-46.

Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, Fougere C. Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15(3):434-43.

Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol*. 2017;27(21):1147-51.

Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(7):397-411.

Triviño T, Abib SCV. Anatomia cirúrgica do fígado. *Acta Cir Bras*. 2003;18(5):407-14.

Turati AO. Análise do perfil diário e dos mecanismos de síntese da melatonina pineal em ratos diabéticos por estreptozotocina tratados com insulina. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2013.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.

Vercelino R, Tieppo J, Dias AS, Marroni CA, Garcia E, Meurer L, Picada JN, Marroni NP. N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008;102(4):370-6.

Vercelino R, Crespo I, de Souza GF, Cuevas MJ, de Oliveira MG, Marroni NP, González-Gallego J, Tuñón MJ. S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in cirrhotic rats. *J Mol Med (Berl)*. 2010;88(4):401-11.

Vieira EK, Bona S, Di Naso FC, Porawski M, Tieppo J, Marroni NP. Quercetin treatment ameliorates systemic oxidative stress in cirrhotic rats. *ISRN Gastroenterol*. 2011:604071.

Villanueva C, Giulivi C. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(3):307-16.

Vriend J, Reiter RJ. The Keap1-Nrf2-antioxidant response element pathway: a review of its regulation by melatonin and the proteasome. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;401:213-20.

Wei W, Qing-Tian L, Ya-Nan C, Russel JR, Xiao-Min Y, Dan-Hua Z, Wan-Ke Z, Biao M, Qing L, Jin-Song Z, Shou-Yi C. Melatonin enhances plant growth and abiotic stress tolerance in soybean plants. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66(3):695-707.

Weiskirchen R, Tacke F. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2014;3(6):344-63.

Woolbright BL, Jaeschke H. Inflammation and cell death during cholestasis: the evolving role of bile acids. *Gene Expr.* 2019;19(3):215-28.

Yaari A, Sikuler E, Keynan A, Ben-Zvi Z. Bromosulfophthalein disposition in chronically bile duct obstructed rats. *J Hepatol.* 1992;15(1-2):67-72.

Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R, Agou F, Kirk HE, Kay RJ, Israël A. Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappa B activation. *Cell.* 1998;93(7):1231-40.

Yang YM, Seki E. TNF α in liver fibrosis. *Curr Pathobiol Rep.* 2015;3(4):253-61.

Zhang JJ, Meng X, Li Y, Zhou Y, Xu DP, Li S, Li HB. Effects of melatonin on liver injuries and diseases. *Int J Mol Sci.* 2017;18(4):673.

Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27-37.

Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2014;20(23):7312-24.

Zimmerman HJ. Drug – Induced Liver Disease. In: Schiff's Diseases of the Liver. Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC. Lippincott-Raver Publishers, Philadelphia N.Y. 1999.

Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR. Nuclear factor- κ B as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med.* 2003;31(1):105-11.

Zininga T, Ramatsui L, Shonhai A. Heat Shock Proteins as Immunomodulants. *Molecules.* 2018;23(11):2846.

7 ARTIGO

7.1 Artigo I

“Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in na experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation”.

Publicado na Revista *World Journal of Gastroenterology* (2016).

Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation

Josieli Raskopf Colares, Elizângela Gonçalves Schemitt, Renata Minuzzo Hartmann, Francielli Licks, Mariana do Couto Soares, Adriane Dal Bosco, Norma Possa Marroni

Josieli Raskopf Colares, Elizângela Gonçalves Schemitt, Renata Minuzzo Hartmann, Adriane Dal Bosco, Graduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90040-060, Brazil

Josieli Raskopf Colares, Elizângela Gonçalves Schemitt, Renata Minuzzo Hartmann, Francielli Licks, Mariana do Couto Soares, Adriane Dal Bosco, Norma Possa Marroni, Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre 90035-903, Brazil

Josieli Raskopf Colares, Elizângela Gonçalves Schemitt, Renata Minuzzo Hartmann, Francielli Licks, Mariana do Couto Soares, Adriane Dal Bosco, Norma Possa Marroni, Laboratory of Oxidative Stress and Antioxidants, Universidade Luterana do Brasil, Canoas 92425-900, Brazil

Francielli Licks, Graduate Program in Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90050-170, Brazil

Author contributions: Colares JR and Marroni NP participated in the study design and development, analysis and interpretation of data and writing of the article; Schemitt EG, Hartmann RM, Licks F, Soares MC and Bosco AD participated in the oxidative stress and immunohistochemistry analyses and the interpretation of results.

Supported by Research and Event Promotion (FIPE) and accomplished in Hospital de Clínicas de Porto Alegre, No. 14-0474.

Correspondence to: Josieli Raskopf Colares, MD, Cellular Biology and Molecular Applied to Health, Laboratory of Oxidative Stress and Antioxidants, Universidade Luterana do Brasil, Avenida Farroupilha 8001, Canoas 92425-900, Brazil. jozy.ma@hotmail.com
Telephone: +55-51-97516065 Fax: +55-51-33598760

Received: June 28, 2016 Revised: August 24, 2016 Accepted: September 14, 2016

Published online: October 28, 2016

Abstract**AIM**

To evaluate the effects of melatonin (Mel) on oxidative stress in an experimental model of bile duct ligation (BDL).

METHODS

Male Wistar rats ($n = 32$, weight ± 300 g) were allocated across four groups: CO (sham BDL), BDL (BDL surgery), CO + Mel (sham BDL and Mel administration) and BDL + Mel (BDL surgery and Mel administration). Mel was administered intraperitoneally for 2 wk, starting on postoperative day 15, at a dose of 20 mg/kg.

RESULTS

Mel was effective at the different standards, reestablishing normal liver enzyme levels, reducing the hepatosomatic and splenosomatic indices, restoring lipoperoxidation and antioxidant enzyme concentrations, reducing fibrosis and inflammation, and thereby reducing liver tissue injury in the treated animals.

CONCLUSION

The results of this study suggest a protective effect of Mel when administered to rats with secondary biliary cirrhosis induced by BDL.

Key words: Antioxidant; Cirrhosis; Fibrosis; Melatonin; Oxidative stress

INTRODUCTION

The liver has a complex structure, allowing it to play a key role in operation and maintenance of several vital functions of the organism, including synthesis activity and excretion of substances. In the liver lobes, hepatocytes are arranged in an orderly fashion out from a central vein, forming the sinusoids, from which they are separated by a narrow space (the space of Disse). This space is the site of the hepatic stellate cells (HSCs), which are known to possess contractile and fibrogenic properties, as well as the ability to synthesize extracellular matrix (ECM)^[1-3].

Obstruction of the biliary tract is a congestive process that leads to numerous changes, such as ductular proliferation, stellate cell activation, and accumulation of ECM in the space of Disse. Occurrence of these changes may lead to the development of liver fibrosis, which, in turn, can lead to secondary biliary cirrhosis^[4]. Cirrhosis of the liver represents the most advanced stage of fibrosis, in which there is evident loss of structure of the hepatic parenchyma. It is directly associated with development of septa and fibrotic nodules, changes in hepatic blood flow, and high risk of liver failure^[5].

Studies have shown that HSCs are directly involved in the process of fibrosis formation and that their activation is influenced by products generated from lipid peroxidation (LPO), formation of reactive oxygen species (ROS), and presence of inflammatory mediators such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukins, and nuclear factor-kappa B^[4,6].

As cirrhosis constitutes a major public health problem^[7], much research is being conducted to develop and test different substances that could be used in its treatment. The objective of such substances aims to improve quality of life, increase survival, slow disease progression, and, possibly, mitigate the damage caused by formation of ROS and free radicals (FRs)^[8,9].

Prolonged obstruction of the bile duct in rats is an experimental model for induction of secondary biliary cirrhosis^[10]. In this model, the characteristic features of the disease are established at approximately 28 d^[10]. Studies have demonstrated that the changes occurring in cirrhosis in human patients are similar to those found in experimental models, including jaundice, hepatomegaly, splenomegaly, abnormal gas exchange, and oxidative damage^[11-15].

Melatonin (Mel; *N*-acetyl-5-methoxytryptamine) is the main product synthesized by the pineal gland, which produces Mel in a rhythmic manner, with production inhibited by light, so that its peak production occurs during the dark phase^[16,17]. Several effects have been attributed to Mel, including antioxidant capacity, as well as anti-inflammatory and immunomodulatory properties^[18-21].

There is an existing important link between cirrhosis, inflammation and oxidative stress; in this sense, treatments are required to protect the liver against these types of damage. Therefore, this present study investigated whether Mel (an anti-inflammatory

agent and antioxidant) would afford hepatic-protection in an experimental model of cirrhosis.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All animal procedures were conducted in accordance with the recommendations of the Health Research Ethics Committee of the Research and Graduate Studies Group at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) in Brazil (approval number 14-0474), and as recommended in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals^[22,23]. The sample comprised male Wistar rats $n = 32$, weight ± 300 g) that were allocated across four groups: CO [sham bile duct ligation (BDL)], BDL (BDL surgery), CO + Mel (sham BDL and Mel administration) and BDL + Mel (BDL surgery and Mel administration). Cirrhosis was induced surgically by BDL as described by Kountouras *et al*^[10].

Animal care and use statement

During the experiment, the animals were kept in boxes lined with wood shavings, under a 12-h light/dark cycle and controlled temperature conditions (18-22 °C), with free access to water and chow. As shown in Figure 1A, animals in the CO and CO + Mel groups only underwent localization and manipulation of the bile duct (sham surgery). Figure 1B and C show the procedures performed in the BDL and BDL + Mel groups respectively: after localization of the bile duct, it was isolated and tied off with two knots made with 3-0 silk thread. All animals were euthanized at 29 d after the start of the experiment^[24].

Administration of Mel

Treatment started on day 15 after BDL surgery. Mel was administered at a dose of 20 mg/kg body weight, always at 7:00 p.m., away from light.

Extraction of plasma

After the blood was collected through the retro-orbital plexus and placed in assay tubes with heparin, it was centrifuged at 4000 rpm for 10-min time. The precipitate was displaced and the plasma was removed with pipette (Labsystems 4500, 100-200 μ L) for the different analyses of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (AP) *via* commercial kit Labtest®.

Liver homogenates

For the preparation of the homogenate we used 9 mL of phosphate buffered solution (1.15% KCl) per gram of tissue (liver) and phenylmethylsulfonyl fluoride at a concentration of 100 mmol/L in isopropanol (10 μ L/mL of KCl). The tissue was homogenized in ULTRA-TURRAX for 40 s at 0-2 °C and subsequently centrifuged for 10 min at 3000 rpm in a refrigerated centrifuge. The precipitate was discarded and the supernatant removed and frozen at -80 °C for subsequent biochemical analyses^[25].

Liver enzyme activity

Activity of the liver enzymes AST and ALT, which are markers of hepatocyte integrity, were measured by the ultraviolet kinetic method. AP was measured by the colorimetric method. All tests were performed in plasma, under routine HCPA laboratory methods, using a Liquiform Labs® test commercial kit.

Hepatosomatic index and splenosomatic index

The liver and spleen were resected and weighed for derivation of the hepatosomatic index (HSI) and splenosomatic index (SSI), which were calculated as the percentage of total organ (liver and spleen) weight divided by the body weight of the animal: $HSI = \text{liver weight (g)}/\text{rat weight (g)} \times 100$; $SSI = \text{spleen weight (g)}/\text{rat weight (g)} \times 100$ ^[26].

LPO

Liver tissue samples were placed in test tubes containing a mixture of trichloroacetic acid (TCA) 10% and thiobarbituric acid (TBA) 0.67%, heated at 100 °C in a water bath for 15 min, and cooled on ice for approximately 5 min. TBA reacts with LPO products to form a Schiff base, whereas TCA is used to denature proteins present and acidify the reaction. After cooling the samples, 1.5 mL of n-butyl alcohol was added to extract the formed pigment. Samples were stirred for 45 s and centrifuged for 10 min at 3000 rpm. Finally, the stained product present in the top fraction was read in a spectrophotometer at a wavelength of 535 nm. The TBARS concentration obtained was expressed as nmol/mg protein^[27].

Activity of antioxidant enzymes and glutathione levels

Superoxide dismutase: The activity of superoxide dismutase (SOD) is defined by its ability to inhibit the reaction of superoxide radicals with adrenaline, and was monitored spectrophotometrically at 560 nm. Results were expressed as USOD/mg protein^[28].

Catalase: The activity of Catalase (CAT) was determined by measuring the decrease in absorption in action medium containing 50 mmol/L phosphate buffered saline (pH 7.2) and 0.3 mol/L hydrogen peroxide. The enzyme activity was assayed spectrophotometrically at 240 nm and expressed as pmol/mg protein^[29].

Glutathione peroxidase: The activity of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPx) was assessed by the NADPH oxidation rate in the presence of reduced glutathione (GSH) and glutathione reductase. Sodium azide was added to inhibit CAT activity. The enzyme activity was measured spectrophotometrically at 340 nm and expressed as nmol/min/mg protein^[30].

Glutathione S-transferase: The glutathione S-transferase (GST) activity assay is based on an enzyme reaction which at 30 °C catalyzes the formation of 1 µmol DNP-SG

using a GSH concentration of 1 mmol/L and chloro dinitrobenzene (CDNB). The enzyme activity was measured spectrophotometrically at 340 nm and expressed as $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein^[31].

GSH reduced: To prepare the homogenate for measuring levels of GSH reduced, for every 1 g of tissue, 20 mL of perchloric acid (2 mmol/L) + EDTA (4 mmol/L) was diluted in 1 mL H₂O. The levels GSH were evaluated spectrophotometrically at 412 nm by quantifying intracellular levels of GSH from modification of 2-nitrobenzoic acid and expressed as $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein^[32].

Histological analysis

After anatomical dissection of the liver of each animal, approximately 2 cm were removed for histological evaluation. The tissues were isolated and immersed in 10% buffered formalin for 24 h for fixation, followed by histological processing (dehydration in a graded alcohol series of six concentrations, clearing in xylol at two concentrations, and embedding in paraffin at 64 °C). The resulting paraffin blocks were attached to a microtome (Leitz® 1512) and slices of 3 μm thickness were obtained. These specimens were placed in a histological bath at 50 °C. For the staining step, the slides were immersed in vats containing hematoxylin-eosin (HE) and Picrosirius red (5 min in each stain). After the hydration stage, the sample was covered with a coverslip and fixed with Canada Balsam or the blade, finalizing the preparation process. The slides were examined by a pathologist who was blinded to group allocation and were photographed under a NIKON LABOPHOT binocular microscope at 200 × magnification.

Immunohistochemistry (iNOS and TNF- α)

For immunohistochemistry, liver tissue samples were fixed in 10% formalin and placed in a histological tissue processor (ANCAP), through a graded ethanol series and two vats of xylene, for dehydration. Specimens were then embedded and blocks were cooled, modeled, and attached to a microtome (Leitz® 1512) to obtain slices 4 μm thick. The resulting slides were incubated with mouse anti-iNOS (SC-7271; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, United States) and TNF- α polyclonal antibodies (SC-52746; Santa Cruz Biotechnology) at a dilution of 1:200 overnight at 4°C, followed by incubation with the secondary antibody (SC-2005; Santa Cruz Biotechnology) at 1:300 for 30 min at room temperature. The slides were analyzed by a pathologist who was blinded to group allocation and were photographed under a NIKON LABOPHOT binocular microscope at 200 × magnification. Digital images were analyzed in Image-Pro Plus version 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD, United States). The expression level was determined by multiplying the average density of the image by the percent area positively stained by the antibodies [brown colored areas obtained by the peroxidase + diaminobenzidine reaction].

Ethical consideration

The present study was accomplished in the HCPA with the approval of the project (No. 14-0474).

Animal care and use statement

All experimental design, collections of biological samples and analyses carried out were in accordance with ethical principles of the Committee Ethics on Animal Use (CEUA-HCPA).

Statistical analysis

Quantitative data are presented as mean \pm SD error. The comparison between groups was performed by one-way analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls procedure. $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

Liver enzyme activity

Evaluation of liver enzyme activity performed in plasma showed a significant increase in all enzymes in the BDL group compared with the control groups, as well as a significant reduction of these values in the BDL + Mel group compared to the BDL group. AST levels increased 379% in the BDL group compared to the CO group, and were 72% reduced in the BDL + Mel group compared to the BDL group. ALT, a specific marker of liver damage, was 186% increased in the BDL group in relation to the CO group and 60% lower in the BDL + Mel group compared to the BDL group. AP levels were 211% higher in the BDL group compared to the CO group and 72% lower in the BDL + Mel group compared to the BDL group ($P < 0.001$) (Table 1).

HSI and SSI

Analysis of HSI and SSI showed significant increases in the BDL group compared to control animals (CO and CO + Mel), as well as a significant decrease in the BDL + Mel group compared to the cirrhotic group (BDL) (Figure 2A and B).

Lipoperoxidation and GSH levels

The evaluation of LPO and GSH levels was performed on homogenized liver.

The LPO analysis revealed a significant increase in LPO markers in the BDL group compared to the CO and CO + Mel groups, and administration of Mel to BDL + Mel animals was associated with a significant decrease in damage in this group. GSH levels were increased in the BDL group compared to the control groups (CO and CO + Mel), and reduced in BDL + Mel compared to BDL (Figure 3A and B).

Antioxidant enzyme activity

Evaluation of SOD, CAT, GPx and GST activity revealed reductions in SOD and CAT in BDL animals compared to controls (CO and CO + Mel), as well as functional recovery of these enzymes in the BDL + Mel group compared to the BDL group. Activity of GPx and GST were increased in the BDL group compared to both control groups (CO and CO + Mel), and decreased in the BDL + Mel group compared with BDL (Table 2).

Histological analysis

HE staining: In the control groups (CO and CO + Mel), histological analysis by HE staining revealed normal liver parenchyma with clearly defined hepatocyte cords. In the BDL group, there was tissue disorganization with loss of hepatocyte cords and inflammatory infiltration. In the cirrhotic group treated with Mel (BDL + Mel), restructuring of these patterns was observed, with formation of hepatocyte cords arising from a centrilobular vein (Figure 4).

Picrosirius staining: Assessment of liver fibrosis in Picrosirius-stained sections revealed absence of fibrotic septa in the control groups (CO and CO + Mel). In animals subjected to BDL, there was positive labeling consistent with presence of fibrotic septa. However, in the BDL + Mel group, fibrosis was minimal (Figure 5).

Immunohistochemistry and quantification of iNOS and TNF- α

Liver specimens from the BDL group exhibited strong positive staining for iNOS (Figure 6) and TNF- α (Figure 7), whereas specimens from the CO and CO + Mel groups did not stain. Treatment with Mel reduced iNOS and TNF- α positivity. Likewise, iNOS and TNF- α expression was significantly reduced in BDL + Mel compared to the BDL group ($P < 0.001$; Figures 6 and 7).

DISCUSSION

The BDL model is widely used to reproduce secondary biliary cirrhosis in animals, as it induces changes that closely resemble those seen in cirrhosis in humans and in experimental cirrhosis induced by carbon tetrachloride (CCl₄)^[4,10,12].

Liver integrity can be evaluated by measuring levels of the enzymes AST, ALT, and AP. Increases in these markers suggest liver dysfunction^[32]. In the present study, animals subjected to BDL exhibited higher levels of AST, ALT, and AP than animals in all other groups. Our findings also demonstrated that administration of Mel to animals with cirrhosis induced by BDL reduced the liver damage caused by duct ligation. These results corroborate the findings of a previous study conducted by Bona *et al*^[4], using the CCl₄ model of cirrhosis, in which animals exhibited a significant increase in AST, ALT and AP levels and equally significant reductions of these markers after treatment with the antioxidant quercetin. Shu *et al*^[9] demonstrated that administration of tanshinone IIA, the active ingredient of *Salvia miltiorrhiza*, reduced ALT and AST levels in an experimental model of cirrhosis in rats.

The terms hepatomegaly and splenomegaly refer, respectively, to enlargement of the liver and spleen. Hepatomegaly is often associated with hepatobiliary diseases. Splenomegaly, in turn, is associated with numerous chronic diseases of the liver^[33,34,35]. In our study, both the HSI and SSI were significantly increased in the BDL group compared with both control groups, and both indices decreased to near control levels when administered Mel in the BDL + Mel group.

The splenomegaly observed in the BDL model is due to portal hypertension as a result of enlargement of the splenic veins. Hepatomegaly, in turn, is secondary to biliary retention and subsequent obstruction of biliary drainage, which ultimately leads to liver fibrosis^[13,14,36]. Using a model of liver damage induced by administration of polychlorinated biphenyls, Oliveira *et al*^[33] found that splenomegaly was minimal in exposed animals given the antioxidant quercetin. LPO causes disorganization of cell membranes, resulting in an increase in membrane permeability and consequent extravasation of enzymes, leading to cell death^[37]. Studies have demonstrated that MDA levels may be associated with increased LPO^[5].

Studies report that, in the pathophysiology of biliary cirrhosis, liver damage is maximized by the action of FRs^[12]. This phenomenon was also observed in the present study by measuring LPO, which was significantly higher in the cirrhotic group (BDL) when compared to the other groups and, accordingly, may have been associated with a process of cell membrane damage. Furthermore, the BDL + Mel group exhibited a significant decrease in LPO as compared with the BDL group, which suggests a protective role of Mel against LPO induced by BDL. These data corroborate a previous study by Bona *et al*^[4] (2012), in which LPO was found to be increased in a model of CCl₄-induced cirrhosis, and quercetin treatment appeared to decrease LPO significantly.

CAT catalyzes the breakdown of H₂O₂ into water and O₂. SOD is regarded as the first line of defense against ROS formation, and decreases in its activity could be related to increased LPO and heightened consumption of the enzyme in an attempt to decrease oxidative damage from ROS dismutation and H₂O₂ formation^[38].

In the present study, activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT was significantly decreased in the BDL group compared to all others, and Mel administration was able to restore activity of these enzymes to near-control levels. These data suggest that treatment with Mel attenuated FR formation secondary to liver damage resulting from BDL-induced cirrhosis. These data corroborate the findings of Bona *et al*^[4] (2012), a study in which rats with CCl₄-induced cirrhosis exhibited an increase in antioxidant enzymes after treatment with quercetin.

Levels of the other enzymes evaluated (GPx and GST), as well as of GSH, were increased in the BDL group compared to the other groups, and decreased significantly to near-control values in the BDL + Mel group. The increases observed in cirrhotic animals may be associated with enzyme activation in an attempt to clear FRs and minimize oxidative damage from the disease, while the reduction in these levels in the group administered Mel suggests decreased FR formation^[39]. These data corroborate the findings of Amália *et al*^[38], who observed that, in a model of CCl₄-induced cirrhosis, GPx, GST and GSH levels were increased, and treatment with quercetin appeared to decrease these values.

Changes in the hepatic parenchyma, as well as formation of fibrotic septa and necrosis, are often associated with the cirrhotic process^[4]. In our study, we observed

loss of tissue organization in the BDL group when assessed by HE staining, demonstrating cellular disorganization with loss of hepatocyte cords and presence of inflammatory infiltrate. In the BDL + Mel group, a restructuring effect was observed, with tissue organization resembling that seen in the CO and CO + Mel groups.

Ferrari *et al*^[40] demonstrated that rats with cirrhosis, whether induced by BDL or by CCl₄, exhibit necrosis, fibrotic nodules, inflammatory infiltrate and cellular changes. Tieppo *et al*^[14] also observed that rats subjected to BDL exhibit hepatic changes with ductular proliferation and fibrosis, findings that improved in cirrhotic rats treated with quercetin.

Fibrosis is the end result of long-term liver injury. Evaluation of fibrotic area in Picrosirius-stained slides revealed increased collagen deposition in the BDL group, in contrast to the BDL + Mel animals, in which collagen deposition was minimal. These data corroborate various studies which observed increased collagen deposition in the liver of rats with cirrhosis induced by CCl₄ and BDL^[4,14]. Saleh *et al*^[41] administered the natural marine compound *Sepia officinalis*, known for its major antioxidant, antibacterial and antitumor effects, and observed a reduction in collagen deposition in animals subjected to bile duct ligation.

Increased production of TNF- α and iNOS is related to acute and chronic inflammatory processes. In the present study, we found higher TNF- α and iNOS expression in animals subjected to BDL, as well as decreased expression of these parameters in animals administered Mel. These findings corroborate those of Gonçalves Schemitt *et al*^[42], who observed lower expression of TNF- α and iNOS in animals treated with glutamine in an experimental model of fulminant hepatic failure.

In view of the evidence presented herein, we suggest that the antioxidant and anti-inflammatory effects of Mel acted to restore serum levels of liver enzymes and the HSI and SSI, decrease LPO, restore antioxidant enzymes, and attenuate collagen deposition, inflammation and tissue damage in the livers of animals subjected to BDL. However, other pathways of Mel action should be studied to elucidate the protective mechanisms involved in this experimental model.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Coordination for the Higher-Level Personnel (CAPES), the Research Support Foundation of Rio Grande do Sul (FAPERGS), the National Council of Research Development (CNPq), the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) and the Lutheran University of Brazil (ULBRA) for their support.

REFERENCES

- 1 **Zimmerman HJ**. Hepatotoxicity: The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1999: 428-433
- 2 **Friedman SL**. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; **275**: 2247-2250 [PMID: 10644669 DOI: 10.1074/jbc.275.4.2247]
- 3 **Friedman SL**. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; **134**: 1655-1669 [PMID: 18471545 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.03.003]
- 4 **Bona S**, Filippin LI, Di Naso FC, de David C, Valiatti B, Isoppo Schaun M, Xavier RM, Marroni NP. Effect of antioxidant treatment on fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *ISRN Gastroenterol* 2012; **2012**: 762920 [PMID: 22577570 DOI: 10.5402/2012/762920]
- 5 **Friedman SL**. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; **38** Suppl 1: S38-S53 [PMID: 12591185 DOI: 10.1016/S0168-8278(02)00429-4]
- 6 **Guimarães EL**, Franceschi MF, Grivicich I, Dal-Pizzol F, Moreira JC, Guaragna RM, Borojevic R, Margis R, Guma FC. Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line. *Liver Int* 2006; **26**: 477-485 [PMID: 16629652 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2006.01245.x]
- 7 **Sherlock S**. Chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatology* 1984; **4**: 25S-28S [PMID: 6420307]
- 8 **Zhang Y**, He Y, Yu H, Ma F, Wu J, Zhang X. Liquiritigenin Protects Rats from Carbon Tetrachloride Induced Hepatic Injury through PGC-1 α Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015; **2015**: 649568 [PMID: 26199636 DOI: 10.1155/2015/649568]
- 9 **Shu M**, Hu XR, Hung ZA, Huang DD, Zhang S. Effects of tanshinone IIA on fibrosis in a rat model of cirrhosis through heme oxygenase-1, inflammation, oxidative stress and apoptosis. *Mol Med Rep* 2016; **13**: 3036-3042 [PMID: 26936326 DOI: 10.3892/mmr.2016.4886]
- 10 **Kountouras J**, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984; **65**: 305-311 [PMID: 6743531]
- 11 **Chang SW**, Ohara N. Increased pulmonary vascular permeability in rats with biliary cirrhosis: role of thromboxane A₂. *Am J Physiol* 1993; **264**: L245-L252 [PMID: 8460713]
- 12 **Tieppo J**, Vercelino R, Dias AS, Marroni CA, Marroni N. [Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress]. *Arq Gastroenterol* 2005; **42**: 244-248 [PMID: 16444380 DOI: 10.1590/S0004-28032005000400010]
- 13 **Vercelino R**, Tieppo J, Dias AS, Marroni CA, Garcia E, Meurer L, Picada JN, Marroni NP. N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; **102**: 370-376 [PMID: 18341514 DOI: 10.1111/j.1742-7843.2007.00181.x]
- 14 **Tieppo J**, Cuevas MJ, Vercelino R, Tuñón MJ, Marroni NP, González-Gallego J. Quercetin administration ameliorates pulmonary complications of cirrhosis in rats. *J Nutr* 2009; **139**: 1339-1346 [PMID: 19494027 DOI: 10.1093/nj/139.10.1339]

- 10.3945/jn.109.105353]
- 15 **Silveira KC**, Viau CM, Colares JR, Saffi J, Marroni NP, Porawski M. Cirrhosis induces apoptosis in renal tissue through intracellular oxidative stress. *Arq Gastroenterol* 2015; **52**: 65-71 [PMID: 26017086 DOI: 10.1590/S0004-28032015000100014]
 - 16 **Espino J**, Pariente JA, Rodríguez AB. Role of melatonin on diabetes-related metabolic disorders. *World J Diabetes* 2011; **2**: 82-91 [PMID: 21860691 DOI: 10.4239/wjd.v2.i6.82]
 - 17 **Acuña-Castroviejo D**, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci* 2014; **71**: 2997-3025 [PMID: 24554058 DOI: 10.1007/s00018-014-1579-2]
 - 18 **Reiter RJ**, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; **917**: 376-386 [PMID: 11268363]
 - 19 **Carrillo-Vico A**, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 2005; **27**: 189-200 [PMID: 16217132 DOI: 10.1385/ENDO:27:2:189]
 - 20 **Neto JAS**, de Castro BF. Melatonina, ritmos biológicos e sono-uma revisão da literatura. *Rev Bras Neurol* 2008; **44**: 5-11
 - 21 **Rosa DP**, Bona S, Simonetto D, Zettler C, Marroni CA, Marroni NP. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. *Arq Gastroenterol* 2010; **47**: 72-78 [PMID: 20520979 DOI: 10.1590/S0004-28032010000100013]
 - 22 **Goldim JR**, Raymundo MM. Pesquisa em saúde e direitos dos animais. 2 ed. Porto Alegre: HCPA; 1997
 - 23 Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, D.C.: The national academies press; 2011
 - 24 **Grigorov I**, Bogojević D, Jovanović S, Petrović A, Ivanović-Matić S, Zolotarevski L, Poznanović G, Martinović V. Hepatoprotective effects of melatonin against pronecrotic cellular events in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Physiol Biochem* 2014; **70**: 441-450 [PMID: 24604251 DOI: 10.1007/s13105-014-0322-7]
 - 25 **Llesuy SF**, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 1985; **71**: 241-249 [PMID: 3861023]
 - 26 **Lizama MAP**, Takemoto RM, Ranzani-Paiva MJT, Ranzani-Paiva MJT, da Silva Ayroza LM, Pavanelli GC. Relação parasito-hospedeiro em peixes de pisciculturas da região de Assis, Estado de São Paulo, Brasil. 1. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). *Acta Sci Biol Sci* 2007; **29**: 223-231 [DOI: 10.4025/actascibiolsoci.v29i2.594]
 - 27 **Buege JA**, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; **52**: 302-310 [PMID: 672633]
 - 28 **Misra HP**, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; **247**: 3170-3175 [PMID: 4623845]
 - 29 **Boveris A**, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide.

- General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; **134**: 707-716 [PMID: 4749271]
- 30 **Flohé L**, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; **105**: 114-121 [PMID: 6727659]
 - 31 **Mannervik B**, Guthenberg C. Glutathione transferase (human placenta). *Methods Enzymol* 1981; **77**: 231-235 [PMID: 7329301]
 - 32 **Beutler E**, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; **61**: 882-888 [PMID: 13967893]
 - 33 **Oliveira CR**, Ceolin J, de Oliveira RR, Schemitt EG, Colares JR, Bauermann LF, Costabeber IH, Morgan-Martins MI, Mauriz JL, da Silva J, Reyes JM, Marroni NP. Efecto de La quercetina sobre La lesión hepática inducida por bifenilos policlorados en ratas. *Nutr Hosp* 2014; **29**: 1141-1148
 - 34 **Vera-Méndez FJ**, Trujillo-Santos AJ, Cano-Sánchez A, Delgado-Romero B. [Toxicity and causes of change of antiretroviral regimen among immigrant patients with HIV infection]. *Rev Clin Esp* 2011; **211**: 66-67 [PMID: 21183167 DOI: 10.1016/j.rce.2010.06.008]
 - 35 **Vargas VP**, Hurtado MR, Villalobos AJA. Esplenomegalia. *Rev Fac Med* 2013; **56**: 37-45
 - 36 **Yaari A**, Sikuler E, Keynan A, Ben-Zvi Z. Bromosulfophthalein disposition in chronically bile duct obstructed rats. *J Hepatol* 1992; **15**: 67-72 [PMID: 1506659]
 - 37 **Mason RP**, Walter MF, Mason PE. Effect of oxidative stress on membrane structure: small-angle X-ray diffraction analysis. *Free Radic Biol Med* 1997; **23**: 419-425 [PMID: 9214578 DOI: 10.1016/S0891-5849(97)00101-9]
 - 38 **Amália PM**, Possa MN, Augusto MC, Francisca LS. Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. *Dig Dis Sci* 2007; **52**: 2616-2621 [PMID: 17431769 DOI: 10.1007/s10620-007-9748-x]
 - 39 **Ferreira ICFR**, Abreu RMV. Stress oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise* 2007; **2**: 32-39
 - 40 **Ferrari RS**, Tieppo M, Rosa DP, Forgiarini Jr LA, Dias AS, Marroni NP. Lung and liver changes due to the induction of cirrhosis in two experimental models. *Arq Gastroenterol* 2013; **50**: 208-213 [PMID: 24322193 DOI: 10.1590/S0004-28032013000200037]
 - 41 **Saleh H**, Soliman AM, Mohamed AS, Marie MA. Antioxidant Effect of Sepia Ink Extract on Extrahepatic Cholestasis Induced by Bile Duct Ligation in Rats. *Biomed Environ Sci* 2015; **28**: 582-594 [PMID: 26383596 DOI: 10.3967/bes2015.082]
 - 42 **Gonçalves Schemitt E**, Raskopf Colares J, Minuzzo Hartmann R, Morgan-Martins MI, Marroni CA, Tuñón MJ, Possa Marroni N. Efecto de la glutamina en el estrés oxidativo y la inflamación en un modelo de rata con insuficiencia hepática fulminante. *Nutr Hosp* 2016; **33**: 92 [PMID: 27238775 DOI: 10.20960/nh.92]

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Bile duct ligation surgery. A: Localization of the bile duct; B: Passage of silk thread for duct isolation; C: Resection of the bile duct.

Figure 2 Mean hepatosomatic and splenosomatic index values in the different experimental groups. All results are expressed as mean \pm SD error. Significant difference existed between the BDL and control groups (CO and CO + Mel) ($^eP < 0.001$). Significant difference existed between the BDL and BDL + Mel groups ($^fP < 0.001$). CO: Control; CO + Mel: Control + melatonin; BDL: Bile duct ligation; BDL + Mel: Bile duct ligation + melatonin; HSI: Hepatosomatic index; SSI: Splenosomatic index.

Figure 3 Lipoperoxidation markers and glutathione levels in the different experimental groups. All results are expressed as mean \pm SD error. Significant difference exists between the BDL and control groups (CO and CO + Mel) ($^eP < 0.001$). Significant difference exists between the BDL and BDL + Mel groups ($^fP < 0.001$). CO: Control; CO + Mel: Control + melatonin; BDL: Bile duct ligation; BDL + Mel: Bile duct ligation + melatonin; GSH: Glutathione; LPO: Lipid peroxidation.

Figure 4 Histological analysis of liver tissue in the different experimental groups. HE staining, 200 \times magnification. The arrow indicates the presence of inflammatory infiltrate. CO: Control; CO + Mel: Control + melatonin; BDL: Bile duct ligation; BDL + Mel: Bile duct ligation + melatonin.

Figure 5 Histological analysis of liver tissue in the different experimental groups. Picrosirius staining, 200 \times magnification. CO: Control; CO + Mel: Control + melatonin; BDL: Bile duct ligation; BDL + Mel: Bile duct ligation + melatonin.

Figure 6 Expression of inducible nitric oxide synthase in the different experimental groups. Magnification 200 \times . All values are expressed as mean \pm SD error. Significant difference exists between the BDL and control groups (CO and CO + Mel) ($^eP < 0.001$). Significant difference exists between the BDL and BDL + Mel groups ($^fP < 0.001$). CO: Control; CO + Mel: Control + melatonin; BDL: Bile duct ligation; BDL + Mel: Bile duct ligation + melatonin; iNOS: Inducible nitric oxide synthase.

Figure 7 Expression of tumor necrosis factor in the different experimental groups. Magnification 200 \times . All values are expressed as mean \pm SD error. Significant difference exists between the BDL and control groups (CO and CO + Mel) ($^eP < 0.001$). Significant difference exists between the BDL and BDL + Mel groups ($^fP < 0.001$). CO: Control; CO + Mel: Control + melatonin; BDL: Bile duct ligation; BDL + Mel: Bile duct ligation + melatonin; TNF- α : Tumor necrosis factor- α .

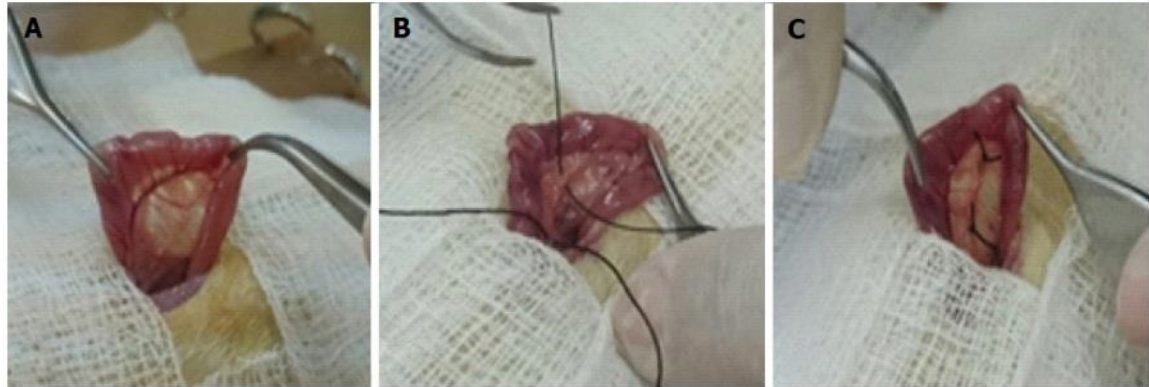
Figure 1

Figure 2

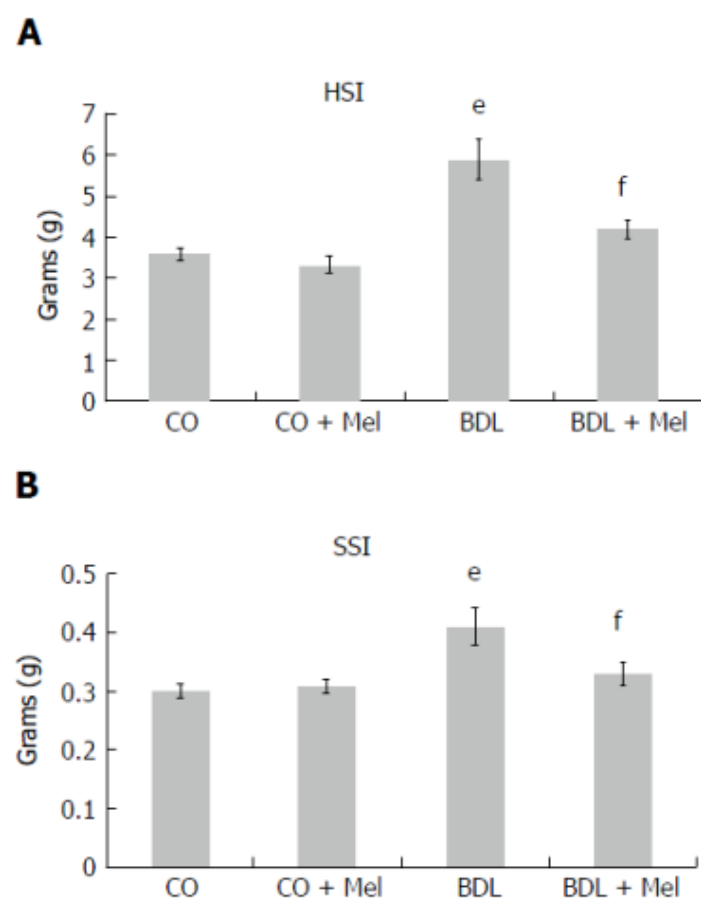


Figure 3

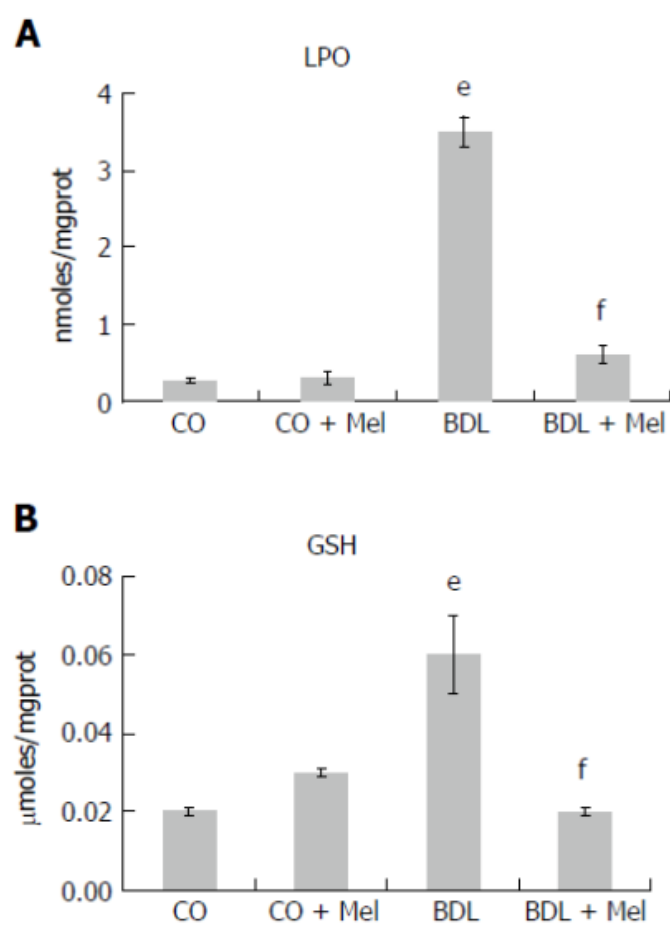


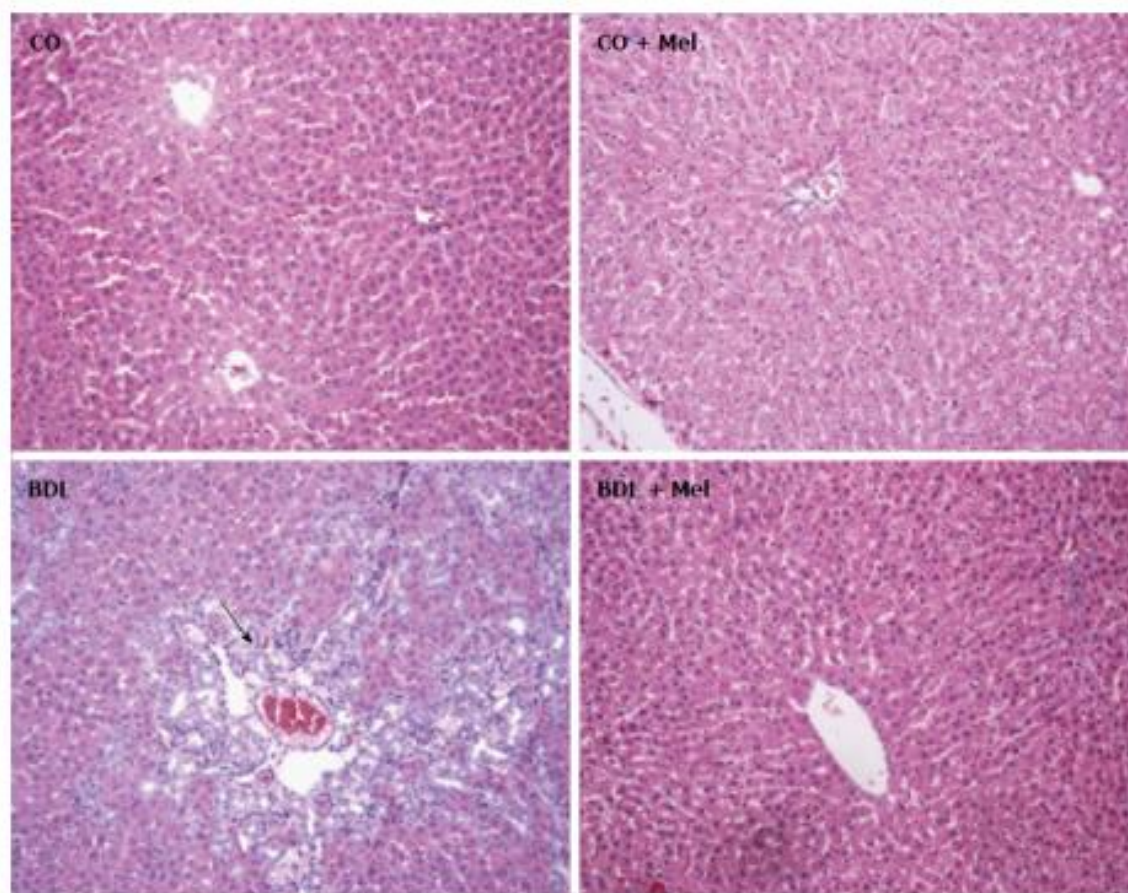
Figure 4

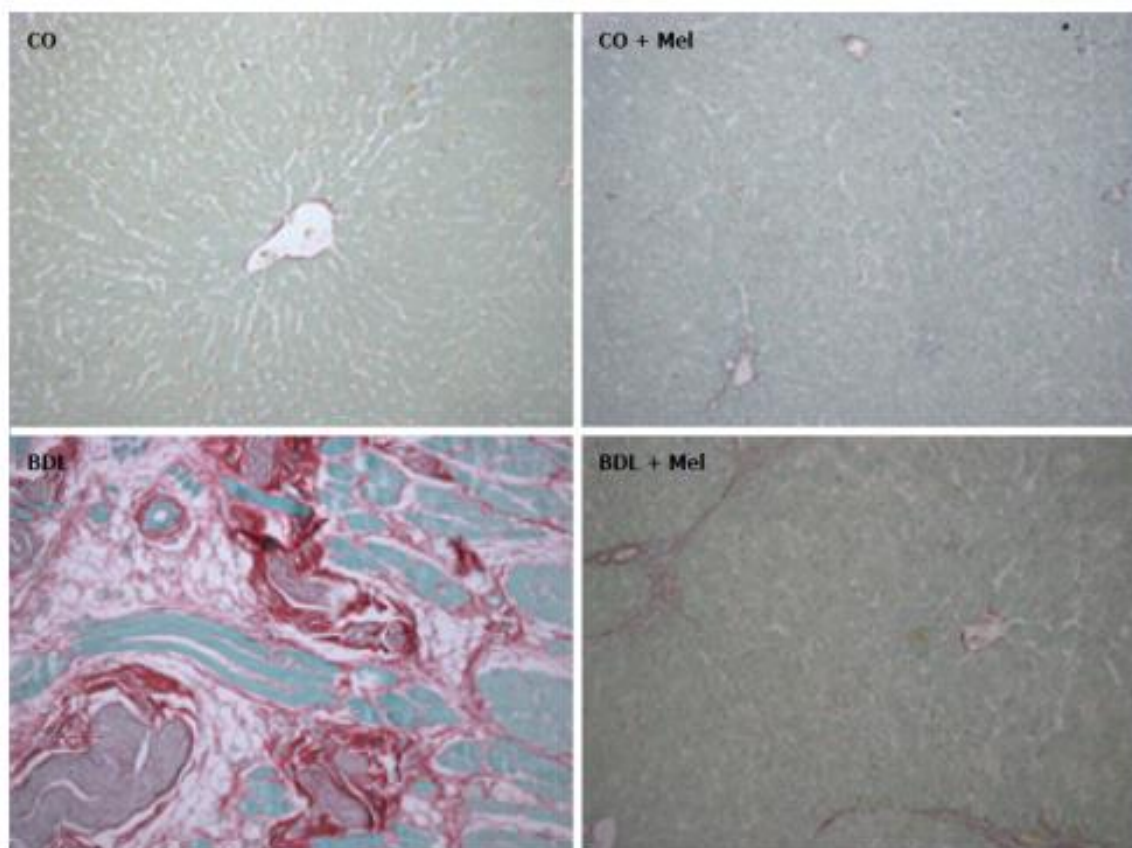
Figure 5

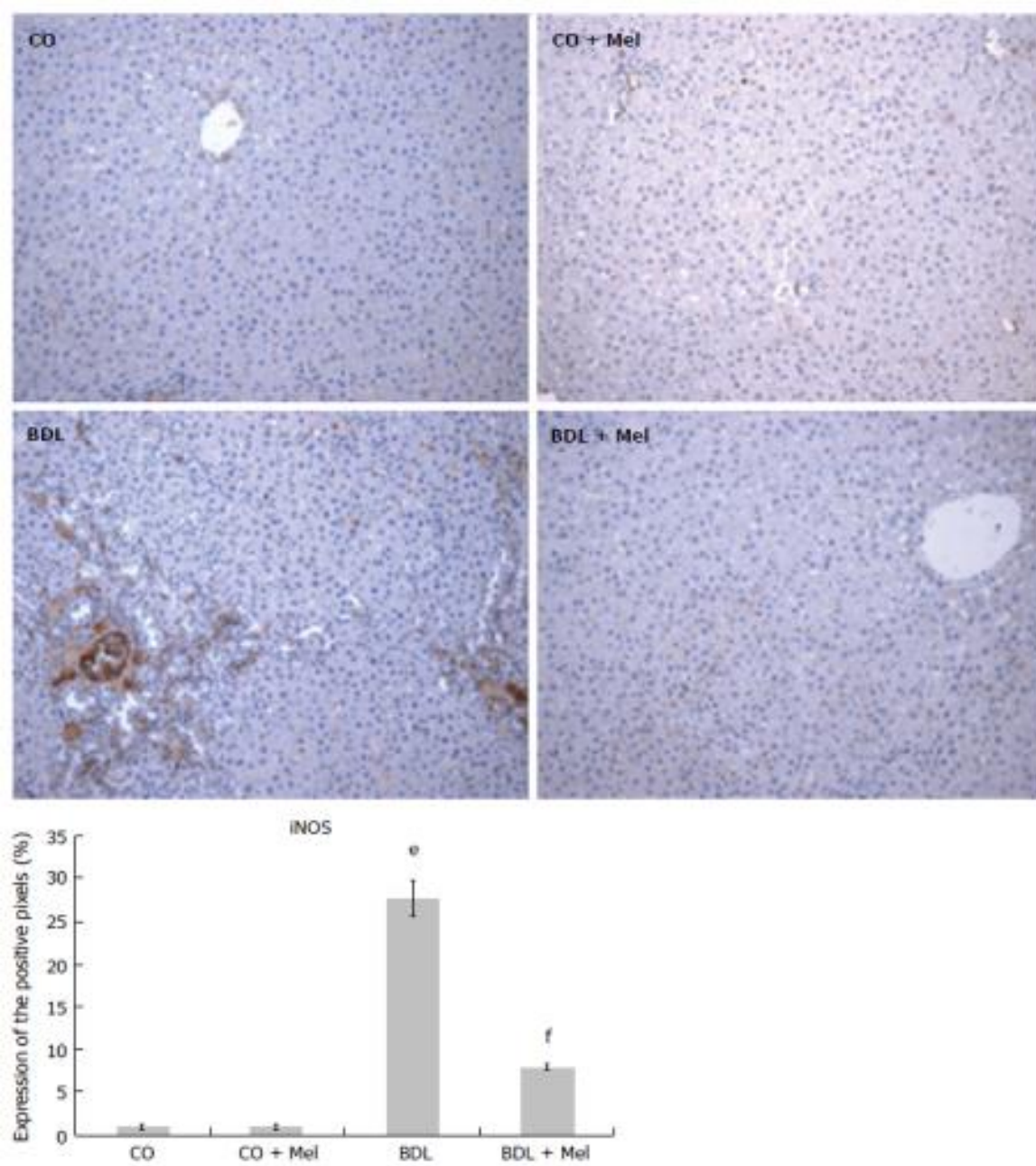
Figure 6

Figure 7

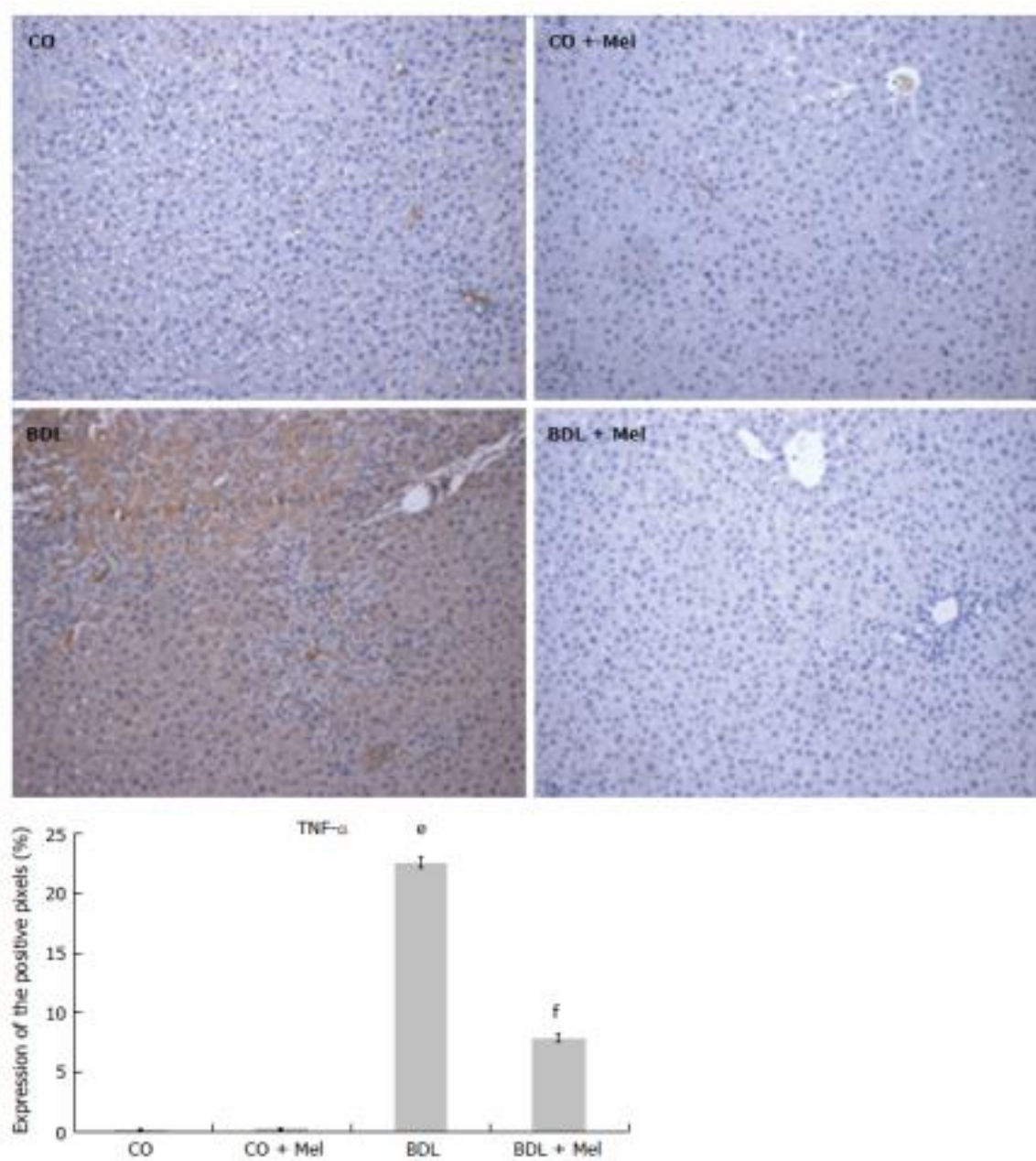


Table 1**Table 1 Plasma levels of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and alkaline phosphatase in the different experimental groups**

Group	AST (U/L)	ALT (U/L)	AP (U/L)
CO	88.8 ± 0.07	37.0 ± 1.9	122.4 ± 13.5
CO + Mel	90.4 ± 8.4	38.8 ± 3.2	111.6 ± 8.1
BDL	425.8 ± 46.6 ^e	105.8 ± 13.5 ^e	381.2 ± 35.5 ^e
BDL + Mel	117.5 ± 18.8 ^f	42.0 ± 3.4 ^f	104.3 ± 11.03 ^f

All concentrations are expressed as mean ± SD error. Significant difference exists between the BDL and control groups (CO and CO + Mel) (^e*P* < 0.001). Significant difference exists between the BDL and BDL + Mel groups (^f*P* < 0.001). CO: Control; CO + Mel: Control + melatonin; BDL: Bile duct ligation; BDL + Mel: Bile duct ligation + melatonin.

Table 2

Table 2 Activity of antioxidant enzymes in the different experimental groups				
Groups	SOD	CAT	GPx	GST
	(USOD/mg prot)	(pmol/mg prot)	(nmol/min/mg prot)	(μ mol/min/mg prot)
CO	2.43 \pm 0.17	2.19 \pm 0.21	6.93 \pm 0.76	2.28 \pm 0.20
CO + Mel	2.31 \pm 0.25	2.21 \pm 0.28	7.15 \pm 1.05	2.57 \pm 0.09
BDL	0.88 \pm 0.21 ¹	1.09 \pm 0.01 ¹	37.78 \pm 2.39 ¹	5.08 \pm 0.43 ¹
BDL + Mel	2.47 \pm 0.22 ²	2.46 \pm 0.04 ²	9.61 \pm 1.20 ²	1.93 \pm 0.21 ²

All values are expressed as mean \pm SD error. ¹Significant difference exists between the BDL and control groups (CO and CO + Mel) (SOD, $P < 0.01$; CAT, $P < 0.05$; GPx and GST, $P < 0.001$); ²Significant difference exists between the BDL and BDL + Mel groups (SOD and CAT, $P < 0.01$; GPx and GST, $P < 0.001$). CO: Control; CO + Mel: Control + melatonin; BDL: Bile duct ligation; BDL + Mel: Bile duct ligation + melatonin. SOD: Superoxide dismutase; CAT: Catalase; GPx: Glutathione peroxidase; GST: Glutathione S-transferase.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo experimental de cirrose biliar secundária induzido por ligadura de ducto biliar mimetiza as lesões hepáticas e alterações fisiológicas características da doença em humanos.

Atualmente, as terapias utilizadas não demonstram total eficácia para o tratamento e atenuação de sintomas decorrentes da cirrose. Neste sentido, o conhecimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão da doença tornam-se de suma importância para a compreensão da sua fisiopatologia e de novos tratamentos como a melatonina, a julgar pelos resultados desta e demais pesquisas, poderá ser uma escolha eficaz como estratégia terapêutica.

8.1 Conclusões do artigo I: *“Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation”*.

A partir dos dados obtidos, a administração da melatonina:

- Diminuiu os níveis das enzimas séricas hepáticas AST, ALT e FA;
- Reduziu o índice hepatossomático e esplenossomático;
- Diminuiu a deposição de colágeno observado pela coloração de picrossírius;
- Reduziu os níveis de LPO;
- Restabeleceu a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GST e os níveis de GSH;
- Diminuiu as alterações histológicas no fígado;
- Reduziu a expressão das proteínas relacionadas a processos inflamatórios (iNOS e NF- κ B).

8.2 Conclusões do artigo II: “*Protective action of Melatonin in rats with secondary biliary cirrhosis*”.

A administração da melatonina foi capaz de:

- Diminuiu os níveis séricos das enzimas séricas hepáticas AST, ALT e FA;
- Reduziu as alterações histológicas observadas pela coloração de HE e pela MEV no fígado;
- Diminuiu os níveis de LPO;
- Aumentou a atividade da enzima antioxidante SOD;
- Diminuiu os níveis dos metabólitos do NO;
- Reduziu os danos ao DNA (ensaio cometa e teste de micronúcleos);
- Diminuiu os níveis da interleucina-1 β e reduziu a expressão do NF- κ B;
- Ativou a expressão do Nrf2 e reestabeleceu a expressão da NQO1;
- Diminuiu o dano celular pela HSP70.

Os resultados obtidos nessa tese demonstram a eficácia do modelo para estudo da cirrose biliar secundária, induzida por ligadura de ducto biliar. Sugerimos que a melatonina devido a sua ação antioxidante, anti-inflamatória e inibidora da iNOS e NF- κ B e pela ativação do sistema antioxidante via Nrf2, possa ser uma terapia de escolha na cirrose biliar secundária.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

A cirrose embora sendo uma condição bem definida clinicamente, ainda é um problema de difícil solução na prática clínica. Os mecanismos intrínsecos envolvidos na fisiopatogenia da doença, bem como os processos de mediação a regeneração do fígado, não são totalmente esclarecidos e podem variar conforme o estadiamento da doença, causa, fatores intrínsecos e até mesmo extrínsecos, dependentes ou não do paciente.

Neste sentido, focados em uma pesquisa translacional, daremos continuidade ao estudo, utilizando o modelo experimental de cirrose biliar secundária induzida por LDB com administração de melatonina, onde avaliaremos diferentes vias como o estresse de retículo endoplasmático, o processo apoptótico e autofagia, para que possamos elucidar os diferentes mecanismos e rotas de atuação da melatonina.

10 ANEXOS

Artigos publicados em periódicos durante a vigência do doutorado (2016-2020).

SCHEMITT, E. G.; HARTMANN, R. M.; COLARES, J. R.; LICKS, F.; SALVI, J. O.; MARRONI, C. A.; MARRONI, N. P. Protective action of glutamine in rats with severe acute liver failure. *World Journal of Hepatology*, v. 11, p. 273-286, 2019.

BOSCO, A. D.; SCHEDLER, F. B.; COLARES, J. R.; SCHEMITT, E. G.; HARTMANN, R. M.; JUNIOR, L. A. F.; DIAS, A. S.; MARRONI, N. P. Melatonin effects on pulmonary tissue in the experimental model of Hepatopulmonary Syndrome. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 45, p. 1-6, 2019.

ROSA, C. G. S.; SCHEMITT, E. G.; HARTMANN, R. M.; COLARES, J. R.; SOUSA, J. T.; BONA, S.; MOREIRA, A. J.; OSTJEN, CRISTIAN AUGUSTO; PICADA, J. N.; CAMPANI, D. P.; DIAS, A. S.; MARRONI, N. P. Effect of therapeutic ultrasound on the quadriceps muscle injury in rats - evaluation of oxidative stress and inflammatory process. *American Journal of Translational Research*, v. 11, p. 6660, 2019.

OSTJEN, C. A.; ROSA, C. G. S.; HARTMANN, R. M.; SCHEMITT, E. G.; COLARES, J. R.; MARRONI, N. P. Anti-inflammatory and antioxidant effect of melatonin on recovery from muscular trauma induced in rats. *Experimental and Molecular Pathology*, 2019.

MIGUEL, F. M.; SCHEMITT, E. G.; COLARES, J. R.; HARTMANN, R. M.; MORGAN-MARTINS, M. I.; MARRONI, N. P. Action of vitamin E on experimental severe acute liver failure. *Arquivos de Gastroenterologia (IMPRESSO)*, v. 54, p. 123-129, 2017.

HARTMANN, R. M.; LICKS, F.; SCHEMITT, E. G.; COLARES, J. R.; DO SOARES, M. DO C.; ZABOT, G. P.; FILLMANN, H. S.; MARRONI, N. P. Protective effect of glutamine on the main and adjacent organs damaged by ischemia-reperfusion in rats. *Protoplasma*, v. 1, p. 1, 2017.

HARTMANN, R. M.; LICKS, F.; SCHEMITT, E. G.; COLARES, J. R.; DA SILVA, J.; MOURA, R. M.; ZABOT, G. P.; FILLMANN, H. S.; MARRONI, N. P. Effect of glutamine on liver injuries induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Nutricion Hospitalaria*, v. 34, p. 548, 2017.

MARRONI, N. P.; SALVI, J. O.; SCHEMITT, E. G.; COLARES, J. R.; HARTMANN, R. M.; LICKS, F.; SANTOS, V. F. L. D.; MARRONI, C. A. Melatonin protects liver in experimental severe acute liver failure. *Journal of Hepatology*, v. 66(1), p. 341-342, 2017.

SALVI, J. O.; SCHEMITT, E. G.; COLARES, J. R.; HARTMANN, R. M.; MARRONI, C. A.; MARRONI, N. P. Action of Melatonin on Severe Acute Liver Failure in Rats. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, v. 12, p. 62-75, 2017.

BOSCO, A. D.; SCHEDLER, F.; COLARES, J. R.; DIAS, A. S.; MARRONI, N.A.P. Hepatopulmonary syndrome: oxidative stress and physical exercise. *European Medical Journal*, v. 2, p. 69-75, 2017.

COLARES, J. R.; SCHEMITT, E. G.; HARTMANN, R. M.; MOURA, R. M.; MORGAN-MARTINS, M. I.; FILLMANN, H. S.; FILLMANN, L.; MARRONI, N. P. Effect of lecithin on oxidative stress in an experimental model of colitis rats induced by acetic acid. *Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro. Impresso)*, v. 36, p. 97-103, 2016.

SCHEMITT, E. G.; COLARES, J. R.; HARTMANN, R. M.; MORGAN-MARTINS, M. I.; MARRONI, C. A.; TUÑÓN, M. J.; MARRONI, N. P. Efecto de la glutamina en el estrés oxidativo y la inflamación en un modelo de rata con insuficiencia hepática fulminante. *Nutrición Hospitalaria*, v. 33, p. 1, 2016.

SCHEMITT, E. G.; COLARES, J. R.; HARTMANN, R. M.; SALVO, J. O.; MARRONI, C. A.; MARRONI, N. P. Anti-Inflammatory Action of Glutamine in Acute Liver Failure Induced by Thioacetamide in Rats. In: *The International Liver Congress, 2016, Barcelona. Journal of Hepatology*, v.64(2), p. 310, 2016.

MARRONI, N. P.; COLARES, J. R.; SCHEMITT, E. G.; SOARES, M. DO C.; FERNANDES, S.; MARRONI, C. A. Melatonin mitigates the Nutritional and Morphological changes of rat tongue with secondary biliary cirrhosis induced by ligation of the common bile duct. In: *The International Liver Congress, 2016, Barcelona. Journal of Hepatology*. v.64, p. 317-318, 2016.

MARRONI, N. P.; COLARES, J. R.; SCHEMITT, E. G.; SOARES, M. DO C.; LICKS, F.; BOSCO, A. D. Melatonin's Effect on the Secondary Biliary Cirrhosis Induced by Ligation of Biliary Duct. In: *The International Liver Congress, 2016, Barcelona. Journal of Hepatology*. v.64(2), p. 574, 2016.

MOURA, R. M.; HARTMANN, R. M.; LICKS, F.; SCHEMITT, E. G.; COLARES, J. R.; SOARES, M. DO C.; FILLMANN, L. S.; FILLMANN, H. S.; MARRONI, N. P. Antioxidant effect of mesalazine in the experimental colitis model induced by acetic acid. *Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro. Impresso)*, v. 36, p. 139-148, 2016.

LICKS, F.; HARTMANN, R. M.; SCHEMITT, E. G.; COLARES, J. R.; FILLMANN, L. S.; FILLMANN, HENRIQUE. S.; MARRONI, N. P. Inflammatory bowel and oxidative stress changes in an experimental model of portal hypertension: action of N-acetylcysteine. *Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro. Impresso)*, v. 1, p. 1, 2016.

COLARES, J. R.; SCHEMITT, E. G.; HARTMANN, R. M.; LICKS, F.; SOARES, M. DO C.; BOSCO, A. D.; MARRONI, N. P. Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation. World Journal of Gastroenterology, v. 22, p. 8918, 2016.

Capítulo de livro publicado durante a vigência do doutorado (2016-2020).

COLARES, J. R.; FERNANDES, S.; SCHEMITT, E. G.; HARTMANN, R.M; MARRONI, C. A.; MARRONI, N. P. Ação da melatonina sobre as alterações nutricionais e morfológicas de ratos com cirrose biliar secundária induzida pela ligadura de ducto biliar. In: Vanessa Bordin Viera; Natiéli Piovesan. (Org.). FUNDAMENTOS DA NUTRIÇÃO. 1ed.Ponta Grossa / PR: Atena, 2017, v. 1, p. 24-39.